BIOCHEMISCH–ANALYTISCHE STUDIEN ÜBER DIE ENZYMAKTIVITÄT DER INDOL–N–METHYLTRANSFERASE UND IHRE PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DURCH VERSCHIEDENE PSYCHOPHARMAKA

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathemat. - Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
WOLFGANG STRÖSSER
aus Hennef - Sieg

Bonn 1979

BIOCHEMISCH–ANALYTISCHE STUDIEN ÜBER DIE ENZYMAKTIVITÄT DER INDOL–N–METHYLTRANSFERASE UND IHRE PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DURCH VERSCHIEDENE PSYCHOPHARMAKA

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathemat. - Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
WOLFGANG STRÖSSER
aus Hennef - Sieg

Bonn 1979

Vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät im Pharmakologischen Institut der Universität Bonn unter Leitung von Herrn Professor Dr. D.A. Kalbhen angefertigt.

1. Referent: Professor Dr. D.A. Kalbhen

2. Referent: Professor Dr. H.J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 1979

Aus dem Pharmakologischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Professor Dr. R. Domenjoz

UNIV. LEIDEN BIBL.

m e i n e r F r a u g e w i d m e t

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 7

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

2.1. Material 17
2.1.1. Geräte 17
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien 17
2.1.3. Arzneimittel-Substanzen 18
2.1.4. Biologisches Material 18

2.2. Methodische Voruntersuchungen zur Bestimmung des enzymatisch gebildeten N,N-Dimethyltryptamins 19
2.2.1. Dünnschicht-Chromatographie 19
2.2.2. Radiochemischer Test 21
2.2.3. Kombinierte Dünnschicht-Chromatographie – Radioisotopen Methode 22
2.2.4. Gaschromatographie 24
2.2.4.1. Derivatisierung 24
2.2.4.2. Gaschromatographische Trennung 25
2.2.4.3. Quantitative Bestimmung 25
2.2.4.4. Standardsubstanz 27
2.2.5. Gaschromatographie-Massenspektrometrie 28

2.3. Isolation der Indol-N-Methyltransferase 32
2.3.1. Homogenisation 32
2.3.2. Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung 32
2.3.3. Proteinbestimmung 33
2.3.4. Dialyse 33
2.3.5. Sephadex-Auftrennung 33
2.3.6. Verteilung der Enzymaktivität 36

2.4. Der Enzym-Test 38
2.4.1. Inkubation 38
2.4.2. Extraktion des Inkubats 40
2.4.3. Kinetik der Indol-N-Methyltransferase 43
2.4.3.1. Abhängigkeit von der Enzymmenge 43
2.4.3.2. Abhängigkeit von der Inkubationszeit 44

2.4.3.3. Einfluß des pH-Wertes auf die N-Methylierung 45
2.4.3.4. Abhängigkeit von der Substratkonzentration 46
2.4.3.5. Bestimmung der Michaelis-Konstanten . 47

2.5. Untersuchungen über den Einfluß psychotroper Substanzen auf die katalytische Aktivität der Indol-N-Methyltransferase 53
2.5.1. Charakterisierung der Substanzen 54
2.5.2. Wirkung der untersuchten Pharmaka und Substanzen auf die Aktivität der Indol-N-Methyltransferase 57

2.6. Diskussion 66

3. ZUSAMMENFASSUNG 83

4. LITERATURVERZEICHNIS 87

Abkürzungsverzeichnis

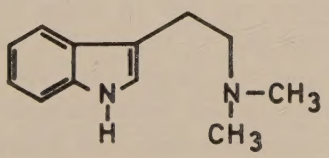
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DMT	N,N-Dimethyltryptamin
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
INMT	Indol-N-Methyltransferase
MTHF	Methyltetrahydrofolsäure
NMT	N-Methyltryptamin
5-OCH_3-DMT	5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin
SAH	S'Adenosylhomocystein
SAM	S'Adenosylmethionin

1. EINLEITUNG

Offensichtlich hegt die Menschheit schon seit undenklichen Zeiten den Wunsch, die irdischen Mühsale und Unzulänglichkeiten mit Hilfe bewußtseinsverändernder Drogen zu überwinden. Die Anwendung berauschender Stoffe zieht sich denn auch durch alle Kulturkreise der Menschheitsgeschichte und läßt sich ohne Rücksicht auf soziale und intellektuelle Unterschiede weit in die Anfänge archaischer Kulturen zurückverfolgen. Auf sumerischen Ideogrammen wird schon vor 6 000 Jahren der Mohn als Rauschmittel erwähnt. Haschisch wurde um 700 Jahre vor Christi Geburt von den Assyrern als Rauschdroge verwendet. Oft ist der Gebrauch dieser psychotropen Substanzen eng verknüpft mit religiösen oder magischen Handlungen.

Neben unterschiedlichen Voraussetzungen für die Metabolisierung und Ausscheidung der Droge hängt die Beeinflussung des Individuums stark von der Persönlichkeitsstruktur des Einzelnen ab. Die Antwort auf die aus Pflanzen gewonnenen Wirkstoffe reicht von einer allgemeinen Dämpfung der Umweltreize, über Euphorie und Rausch bis hin zu einer allein aus imaginären Bildern des Bewußtseins konstruierten Traumwelt.

Um die Mitte der fünfziger Jahre überraschten SZARA und seine Mitarbeiter (90, 93, 94) sowie ARNOLD und HOFMANN (2) mit Untersuchungsergebnissen über N,N-Dimethyltryptamin (DMT), dessen Applikation beim Menschen massive psychopathologische Veränderungen hervorruft, die von gravierenden, zum Teil recht unangenehmen, somatischen Nebenwirkungen begleitet sind.



N,N-Dimethyltryptamin

FISH, HORNING und JOHNSON (26) hatten das DMT neben dem Vorkommen an Bufotenin, einer weiteren halluzinogenen Substanz, in einem von Eingeborenen Haitis bei religiösen Zeremonien gebrauchten Schnupfpuder entdeckt. Die Droge wurde aus den Samen und Blättern der Mimosenart Piptadenia Peregrina bereitet und diente den Medizinmännern dazu, Trancezustände mit Halluzinationen zu erreichen.

Wir zitieren aus dem Protokoll der Arbeit von SAI HALASZ aus der Gruppe um SZARA, der die Wirkung des N,N-Dimethyltryptamins an 30 normalen Personen, meistens Ärzten (17 Männer, 13 Frauen) im Alter zwischen 20 und 42 Jahren prüfte (90):

Dr. E. Ch., 27 Jahre, 50 mg DMT i.m., 27.8.56:

"Jetzt erheben sich die hellen, metallschimmernden Wände, dann sinken sie wieder nieder. Es ist, als ob das Zimmer atme. Auf der ganzen Fläche kreisen vielfarbige - gelbe, hellgrüne, rosa und blaue - Fischschuppen. Die glänzende Kugel der Lampe beugt sich kreisend näher. Ich sehe wiederum das Gitter, doch ist jetzt dahinter kein Rauch, sondern nur glatte, runde, grüne Steine."

Eine Versuchsperson erklärte am nächsten Tag folgendes:

"Ich fühlte, daß ich vergiftet wurde und sterben werde und schon nichts dagegen tun konnte. Trotzdem kämpfte ich einen seelischen Kampf, ob ich bis zum letzten Moment am Leben hängen oder ruhig sterben sollte; das letztere war sehr verlockend, da ich mich sehr wohl fühlte. Dieser seelische Kampf äußerte sich in meinem Motorium als Unruhe; ich spürte und wußte alles."

Neben weiteren Arbeiten, in denen das DMT zum Teil unter ganz speziellen Fragestellungen untersucht wurde (14, 22, 24, 33, 92) erschien 1976 eine Veröffentlichung von BICKEL und Mitarbeitern (10), die die Anwendung von DMT in einem Doppel-Blind-Versuch an 26 Versuchspersonen und 12 Kontrollen wiederholten. Ihre Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse von SZARA und Mitarbeitern, indem sie ebenfalls von Veränderungen des Leib-Raumerlebens, optischen Sinnestäuschungen und ausgeprägten Konzentrations- und Denkstörungen berichteten; wegen der niedrigeren Dosierung, ein Drittel bis ein Viertel der bisher in vergleichba-

ren Untersuchungen verwendeten Substanzmenge, traten Angstzustände und Wahnvorstellungen weniger häufig auf.

Wir geben aus den Erlebnisberichten dieser Arbeit ebenfalls einige Zitate wieder:

"Ich befand mich in einer Raumkapsel, die durchs Weltall schwebte... Um mich herum baute sich ein Röhrensystem auf, das vorerst knallrot war, mit der Zeit aber auf grün wechselte. Die Farben waren von einer außerordentlichen Intensität wie ich sie in der wachen, normalen Wahrnehmung noch nie empfand."

"Mein Körper zerfloß (sich bewegend) in alle Richtungen, wie ein Oktopus, der mit seinen Armen spielt."

"Die Versuchsleiter empfand ich sehr weit von mir entfernt, teilweise wie naive Unwissende aus einer anderen Welt, die mich amüsierten."

"Ich hatte das Gefühl, von allen anderen nicht gesehen zu werden und fühlte mich unheimlich glücklich."

Stellt man diese retrospektiven Äußerungen der Probanden psychiatrischen Krankheitsbildern gegenüber, läßt sich eine gewisse Ähnlichkeit der psychotischen Zustände nicht übersehen. Zusammen mit den Erkenntnissen über die psychotomimetischen Effekte von Meskalin, dem Inhaltsstoff der Rauschdroge Peyotl, und LSD, einer 1943 von A. HOFMANN zufällig aufgefundenen,halluzinogenen Substanz, gaben diese Beobachtungen schon bald nach ihrer Entdeckung den Anstoß für die Hypothese, daß chemische Wirkstoffe in der Lage sind, beim Menschen psychische Veränderungen hervorzurufen, die gewissen Merkmalen der Schizophrenie gleichen.

Basierend auf der strukturellen Ähnlichkeit zwischen natürlich vorkommenden Neurotransmittern und Halluzinogenen postulierten OSMOND und SMYTHIES (80), daß normal im menschlichen Organismus vorkommende, biogene Amine durch Methylierung in toxische Substanzen metabolisiert werden können, die schließlich für das Zustandekommen schizophrener Symptome verantwortlich sind.

Dieser abnorme Methylierungsprozeß im Stoffwechsel schizophrener Patienten wurde zunächst nur für die O-Methylierung vermu-

tet. Mit Bekanntwerden der halluzinogenen Wirkung von Psilocybin, Psilocyn und DMT, bei denen es sich um N-Methylderivate des Tryptamins handelt, wurde angenommen, daß alle Halluzinogene entweder O-Methyl- oder N-Methylderivate der zerebalen Neurohormone Noradrenalin, Dopamin und Hydroxytryptamin sind.

Im Vergleich mit den Zustandsbildern nach Meskalin- oder LSD-Gebrauch erwiesen sich die durch DMT hervorgerufenen Phänomene jedoch als besonders bemerkenswert:

Der plötzliche Wirkungseintritt läßt vermuten, daß das DMT selbst - ohne metabolisiert zu werden - den psychotischen Einfluß ausübt. Der kurze Verlauf der Psychose, ca. 50 - 60 Min., und die Unwirksamkeit bei peroraler Applikation deuten auf einen schnellen Abbau der Substanz hin.

Der entscheidende Unterschied zu den bisher bekannten psychotropen Substanzen ergab sich allerdings durch die Entdeckung eines Enzyms, das die Bildung des N,N-Dimethyltryptamins aus seinen Vorstufen Tryptamin und N-Methyltryptamin (NMT) ermöglicht. AXELROD (3) beschrieb nach Untersuchungen mit Kaninchenlunge eine unspezifische N-Methyltransferase, die die Übertragung der Methylgruppe von S'Adenosylmethionin (SAM) auf verschiedene Catechol- und Indolamine katalysiert. MANDEL et al. (63) und WYATT et al. (103, 104) konnten das Enzym in der menschlichen Lunge sowie im Humanblut als Indol-N-Methyltransferase (INMT) verifizieren und einen biochemischen Ablauf für die endogene Bildung von N,N-Dimethyltryptamin entwerfen (Abb. 1).

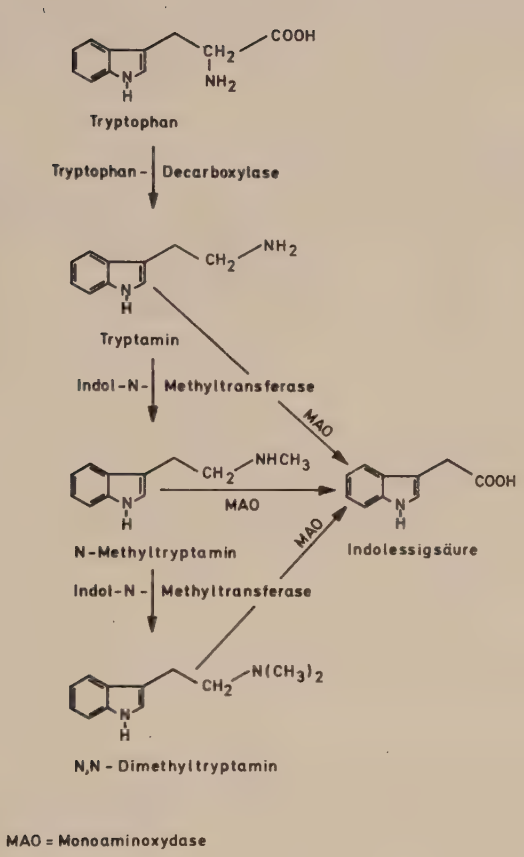


Abb. 1: Bildung von N,N-Dimethyltryptamin aus Tryptophan

Zu diesem Zeitpunkt war das Vorkommen der Substrate in verschiedenen Geweben von Tieren und Menschen bereits untersucht worden. So konnte Tryptamin von MARTIN et al. (68), SAAVEDRA et al. (88) und SLOAN et al. (95) nachgewiesen werden; ausreichende Konzentrationen für den N-Methyldonator SAM fanden BALDESSARINI und KOPIN (5) und GAITONDE (28).

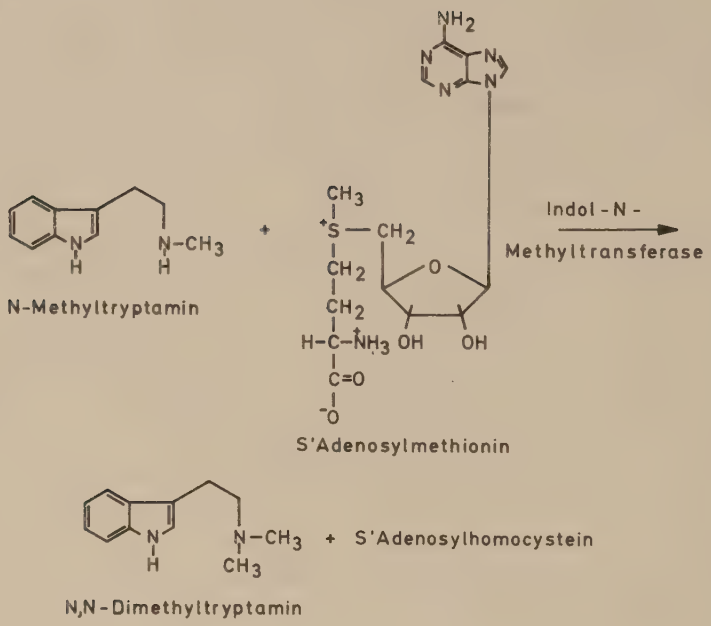


Abb. 2: Ablauf der enzymatischen Reaktion zur Bildung von N,N-Dimethyltryptamin

Nachdem die physiologischen Voraussetzungen zur Bildung dimethylierter Indole bekannt waren, stellte sich die Frage: Existieren halluzinogene Indole in den Körperflüssigkeiten oder Geweben schizophrener Patienten?

Bereits 1964 hatten FRANZEN und GROSS (27) das DMT im Blut und Urin von Schizophrenen und Normalpersonen nachgewiesen. Andere Arbeitsgruppen beteiligten sich an der Suche nach abnormen Metaboliten des Indolalkylamin-Stoffwechsels, kamen dabei jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen:

Einen positiven Befund konnten ROSENGARTEN et al. (86), NARASIMHACHARI et al. (72, 73), GREENBERG (32) und HIMWICH et al.

(37) feststellen, während die Bestimmungen von WYATT et al. (101, 102), BIDDER et al. (11), LIPINSKI et al. (59), CARPENTER et al. (15), OON et al. (79) und HUSZKA et al. (43) negativ verliefen.

Für diese zum Teil stark divergierenden Aussagen wurden unterschiedliche chemische Untersuchungsmethoden, Medikamten- und Nahrungsmitteleinflüsse und Hospitalisierungseffekte verantwortlich gemacht.

Parallel zu diesen Arbeiten beschäftigten sich die Untersucher mit der Aufarbeitung und Reinigung der Indol-N-Methyltransferase sowie mit der Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zur Beobachtung der enzymatischen Reaktion.

Auch hier gab es unter den Autoren widersprüchliche Aussagen über das Vorkommen und die Verteilung des Enzyms bzw. seiner Spezifität für Tiere (AHN et al., 1; HSU und MANDELL, 41; MANDEL et al., 64; MORGAN und MANDELL, 71; SAAVEDRA und AXELROD, 87; SAAVEDRA et al., 89; THITHAPANDHA, 96; WALKER et al., 98;) und für den Menschen (DOMINO et al., 23; HELLER, 35; MANDEL et al., 63; MANDELL und MORGAN, 67; NARASIMHACHARI et al. 77; WYATT et al., 103, 104).

Als LADURON 1972 (48) von einer Mitwirkung der Methyltetrahydrofolsäure (MTHF) als möglichem Methyldonator bei der enzymatischen Übertragung der Methylgruppe auf Indole berichtete, gerieten die Nachforschungen ins Stocken. Er führte zahlreiche Untersuchungen mit aufgearbeiteten Proben mehrerer Gewebe durch und stellte die eindeutig günstigeren Ergebnisse den mit S'Adenosylmethionin erzielten gegenüber (49, 50). Andere Untersucher übernahmen seine Arbeitsmethoden (6, 41) und entschieden sich sogar allein für die MTHF-Theorie, ohne den Vergleich mit SAM zu suchen (97). Für das MTHF abhängige Enzym wurde eine weite Verbreitung in verschiedenen Geweben der unterschiedlichsten Tierspezies postuliert (6, 50). Die meisten Arbeitsgruppen

fanden jedoch primär ein Vorkommen im Hirnbereich, wo auch die notwendigen Konzentrationen der beteiligten Substrate vorhanden sind (7, 41, 53).

Das Problem der N-Methylierung von Indolen unter Beteiligung der MTHF wurde schließlich durch Ergebnisse von ROSENGARTEN (85) auf die Fragwürdigkeit der zunächst kritiklos übernommenen Inkubationsbedingungen hingewiesen. In dieser Arbeit wurden statt der dimethylierten Indole Tetrahydro-ß-carboline als mögliche Enzymprodukte aufgrund von DC-Bestimmungen diskutiert. Eine schon längst überfällige Absicherung dieser Theorie durch genauere analytische Verfahren mußte folgen. Zu den DC-Bestimmungen, photometrischen und radiometrischen Methoden in der Endkontrolle der beim enzymatischen Test gebildeten Produkte traten Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS).

Es erwies sich als unhaltbar, daß die MTHF sowohl bei "in-vitro" als auch "in-vivo" Bedingungen in der Lage ist, die aus anderen Enzym-Reaktionen für sie bekannte Übertragung der Methylgruppe (GREENBERG, 31) auch für die Indole zur Bildung dimethylierter Derivate zu spezifizieren. Von LAUWERS et al., aus der Arbeitsgruppe um LADURON, wurde 1975 durch GC-MS-Untersuchungen klargestellt, daß aus 5-Methyltetrahydrofolsäure - katalysiert durch die MTHF-Reduktase und eine Katalase - entstehender Methanol bzw. Formaldehyd für eine chemische Reaktion mit dem Substrat verantwortlich sind (49) (siehe Abb. 3).

In einer spontan ablaufenden Aldehyd-Amin-Kondensation bilden sich tricyclische Norharmalin-Alkaloide vom ß-Carbolintyp. Auf einen möglichen Zusammenhang dieser Substanzklasse mit der Schizophrenie wurde 1961 von MC ISAAC hingewiesen (44).

Das Scheitern dieser Theorie aufgrund oberflächlicher Arbeitsweise ließ die Untersuchungsgruppen kritischer werden.

So konnten MELLER et al. (69) die von AXELROD et al. (4) beschriebene Beobachtung bestätigen, daß die Freisetzung von

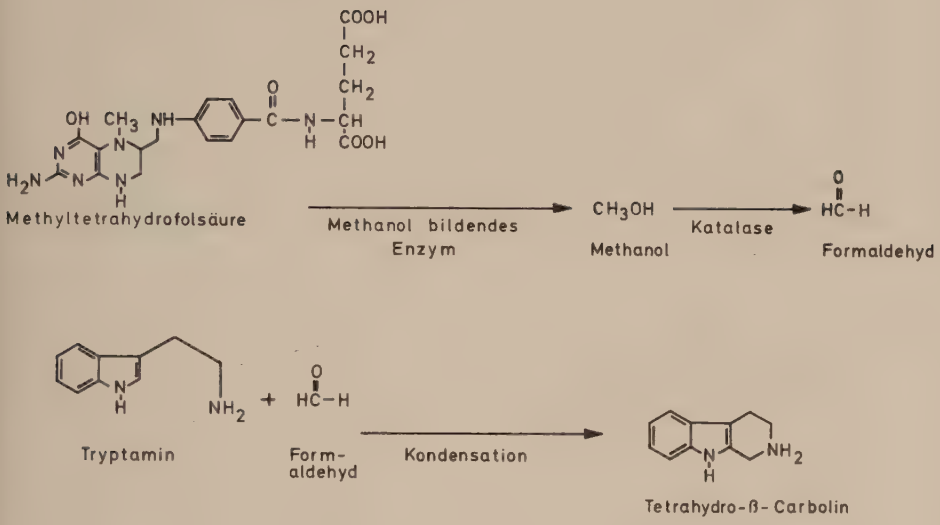


Abb. 3: Hypothetischer Ablauf der Entstehung von Tetrahydro-ß-Carbolin unter Beteiligung des Methyldonators Methyltetrahydrofolsäure

Formaldehyd und die damit verbundene Bildung von ß-Carbolinen auch aus SAM als Methyldonator möglich ist. Damit waren die Resultate dieser enzymatischen Reaktion ebenfalls fragwürdig geworden.

Problemstellung:

Die Schwierigkeiten einer exakten Identifizierung dimethylierter Indole im Rahmen ihrer quantitativen Bestimmung entweder in Körperflüssigkeiten oder nach Inkubation der Substrate mit dem entsprechenden Enzymsystem müssen wohl als Grund dafür angesehen werden, daß die Literatur über halluzinogene Indole und ihre Beziehung zur Schizophrenie immer unübersichtlicher wurde und manchen Untersucher dazu bewegte, die Nachforschun-

gen einzustellen. Nur die Ergebnisse sind diskutabel geblieben, die mit Hilfe empfindlichster analytischer Verfahren erzielt wurden, wie sie z. B. die Gaschromatographie oder die kombinierte Gaschromatographie - Massenspektrometrie darstellen. Deshalb ist es beim gegenwärtigen Stand der Forschungen unverständlich, daß die Aktivität des Enzyms und seine mögliche Beeinflussung immer noch mit Hilfe einfacher Bestimmungen wie der DC und des radiochemischen Tests analysiert werden (29, 62, 82, 91).

Das Vorkommen psychotisch aktiver Substanzen wie Bufotenin, 5-Methoxytryptamin und N,N-Dimethyltryptamin in Blut, Urin und Geweben von Menschen kann mittels GC-MS-Bestimmungen als gesichert angesehen werden. Seit der Auffindung des N-methylierenden Enzyms für Indole sind 15 Jahre vergangen, in denen - wie bereits erwähnt - in vielfältiger Weise versucht wurde, die zugrunde liegende enzymatische Bildung abnormer Methylierungsprodukte und deren Beteiligung an der Pathogenese der Psychosen aufzuklären (N-Methylierungshypothese der Indole).

Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein, zu untersuchen,

1. ob die Indol-N-Methyltransferase die Reaktion N-Methyltryptamin zu N,N-Dimethyltryptamin katalysieren kann, und

2. ob eine Beeinflussung dieser Reaktion durch Psychopharmaka und Psychodysleptika möglich ist, und

3. ob sich eine mögliche Beteiligung dieser Reaktion am Wirkungsmechanismus einzelner Psychopharmakagruppen (Neuroleptika, Antidepressiva, Psychodysleptika) nachweisen läßt.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Fraktionssammler, Firma GILSON MEDICAL

Gaschromatograph, 5750 G mit Flammenionisationsdetektor, Firma HEWLETT PACKARD

Gaschromatograph-Massenspektrometer, 4000 mit Datensystem, Firma FINNIGAN

Laborzentrifuge, Junior 15 000, Firma CHRIST

Liquid-Szintillations-Spektrometer, C 24 25, Firma PACKARD

Spektralphotometer, PMQ II, Firma ZEISS

Ultra Turrax, Firma JANKE und KUNKEL KG

Ausrüstung zur Dünnschicht-Chromatographie nach STAHL, Firma DESAGA

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

S'Adenosyl-L-Methionin-sulfat, Firma BOEHRINGER, Mannheim

S'Adenosyl-L-[Methyl-^{3}H]-Methionin, 250 µCi (spezif. Aktivität: 11,3 Ci/mMol), Firma AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig

Albumin (aus Rinderblut), Firma MERCK, Darmstadt

Amphetaminsulfat, Firma MERCK, Darmstadt

N,N-Dimethyltryptamin Base, Dr. Riemek, Pharmazeut. Institut, Uni Bonn

Folin-Ciocalteu Phenolreagenz, Firma MERCK, Darmstadt

Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten, Schichtdicke 0,25 mm, 20 cm x 20 cm, Firma MERCK, Darmstadt

5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin Base, Firma ALDRICH, Beerse

N-Methyltryptamin Base, Firma FLUKA, Neu-Ulm

Propionsäureanhydrid, Firma FLUKA, Neu-Ulm

Sephadex G-100, Firma PHARMACIA, Uppsala

Silicon OV-101, 3 % und 5 % auf Chromosorb Q, 80/100 mesh, Firma WGA, Düsseldorf

Die Substanzen wurden im höchsten Reinheitsgrad, der im Handel erhältlich war, bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

2.1.3 Arzneimittel-Substanzen

DECENTAN^{R}	Perphenazin Base, Firma MERCK, Darmstadt
FORIT^{R}	Oxypertin Säure, Firma WINTHROP, Neu-Isenburg
MEGAPHEN^{R}	Chlorpromazin-HCl, Firma BAYER, Leverkusen
SAROTEN^{R}	Amitryptilin-HCl, Firma TROPON, Köln
TOFRANIL^{R}	Imipramin-HCl, Firma CIBA-GEIGY, Wehr
TRIPERIDOL^{R}	Trifluperidol Base, Firma JANSSEN, Beerse

2.1.4 Biologisches Material

Die Gewebeproben wurden männlichen Neuseeländer Albino Kaninchen entnommen, die 6 bis 8 Monate alt waren.Wir hielten die Tiere unter gleichbleibenden Laborbedingungen (Einzelhaltung, 22-25^{o} C Raumtemperatur); sie erhielten Trockenfutter (Altromin K) und Wasser ad libitum. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme wogen sie zwischen 4,1 und 4,8 kg.

2.2 Methodische Voruntersuchungen zur Bestimmung des enzymatisch gebildeten N,N-Dimethyltryptamins

2.2.1 Dünnschicht - Chromatographie

Die dünnschicht-chromatographische Auftrennung der beiden Substanzen N-Methyltryptamin (NMT) und N,N-Dimethyltryptamin (DMT) sollte einerseits eine direkte qualitative Aussage über das enzymatisch entstandene Produkt ermöglichen; zum anderen sollte sie zur Vortrennung für den anschließenden radiochemischen Test dienen und in Verknüpfung mit diesem zu einer ersten Absicherung in der Frage der Produktidentifikation beitragen.

Wir verwendeten zur Chromatographie der Substanzen Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} von Merck, die in einem Chromatographie-Ofen 30 Min. bei 110° C aktiviert wurden.

Die nach Extraktion des Inkubationsansatzes gewonnene Lösung (siehe dort) wurde für den radiochemischen Test mit 25 µg NMT und 25 µg DMT als Schlepper versetzt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand, in 100 µl Aethylacetat aufgenommen, wurde je zur Hälfte quantitativ auf 2 Dünnschichtplatten aufgetragen und zusammen mit den Standardsubstanzen eindimensional über eine Laufstrecke von 15 cm bei Kammersättigung in den beiden Fließmittelsystemen I und II entwickelt.

Fließmittel I:

n-Butanol/Essigsäure/Wasser 80 : 20 : 20
RF - Werte: NMT: 0,43
DMT: 0,35

Fließmittel II:

Chloroform/Methanol/NH_3 (25%, wässr.Lösg.) 60 : 40 : 2
RF - Werte: NMT: 0,27
DMT: 0,68

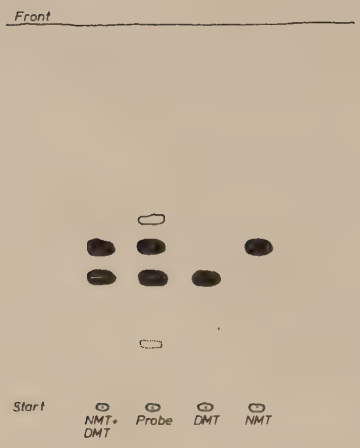


Abb. 4a: Fließmittel I:
n-Butanol/Essigsäure/Wasser (80:20:20)

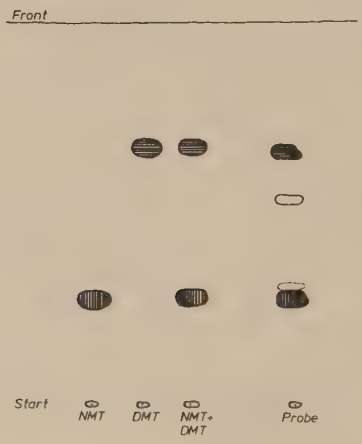


Abb. 4b: Fließmittel II:
Chloroform/Methanol/NH_3 (25 %, wäßr. Lösg.) (60:40:2)

Abb. 4: Dünnschicht-Chromatogramme einer biologischen Probe

Nach dem Trocknen wurden die Flecken entweder unter dem UV-Licht (254 nm) markiert oder durch Besprühen der Platte mit einer Mischung aus 100 ml 5%iger aethanolischer Zimtaldehyd-Lösung + 5 ml Salzsäure (36 %) sichtbar gemacht (DMT: blau-violett).

Wie aus den Abbildungen 4.a und 4.b der Chromatogramme zu ersehen ist, gelang es uns, die Anwesenheit des gesuchten DMT's zu bestimmen. Dabei ist zu erkennen, daß die Auftrennung der Substanzen im basischen Fließmittel II besser gerät als in Fließmittelsystem I.

2.2.2 Radiochemischer Test

250 µCi S'Adenosyl-L- [Methyl-^{3}H]Methionin (SAM-^{3}H),das zur Aufbewahrung in verdünnter Schwefelsäure vom pH 2 - 3 gelöst war, wurde mit nicht radioaktivem SAM in 0,02 M Kaliumphosphat-Puffer verdünnt, so daß eine 1 x 10^{-4} molare Lösung resultierte, die in 1,00 ml 10 µCi SAM -^{3}H enthielt und in dieser Konzentration für die meisten Tests verwendet wurde.

Von der durch Extraktion der Inkubationsproben erhaltenen organischen Phase mit dem darin gelösten, zum Teil radioaktiv markierten DMT wurden 5,0 ml in Zählgläser überführt. Nach Zugabe von 10.0 ml Szintillationsflüssigkeit wurden die Proben in einem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer (PACKARD C 2425) gezählt.

Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus:

4,00 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
0,05 g 2,2'-p-Phenylenbis(5-phenyloxazol) (POPOP) und
1000,00 ml Toluol.

Die Zählausbeute für Tritium betrug durchschnittlich 64 %. Es wurden mindestens 10 000 Impulse bzw. 10 Min. lang gezählt, um den Zählfehler unter 1 % zu halten.

Die cpm-Werte der umgesetzten Proben wurden in direktem Verhältnis mit den Zählraten der Standards verglichen. Als Blindwert diente einmal ein Ansatz, dem statt der Substratlösung bidestilliertes Wasser zugesetzt wurde; für einen zweiten Blindwert wurde die Proteinlösung durch 5minütiges Erhitzen im Wasserbad bei 90° C inaktiviert, bevor sie ins Inkubationsmedium pipettiert wurde.

Die Zählraten zur Messung der Kinetik sind Mittelwerte von Doppel-Bestimmungen. Zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten und zur Untersuchung der Hemmwirkung von Arzneimitteln wurden Dreifach-Bestimmungen verwendet.

2.2.3 Kombinierte Dünnschicht-Chromatographie - Radioisotopen Methode

Zur Erfassung des radioaktiven Materials nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurden die Laufstrecken auf den Kieselgel-Platten in 1 cm breite Streifen eingeteilt, und die Areale quanitativ von der Platte abgetragen. Das Kieselgel wurde mit 3,0 ml Aethylacetat eluiert, die Lösung zur Trockene eingedampft, in 5,0 ml Toluol aufgenommen und in 10,0 ml Szintillationsflüssigkeit wie vorher beschrieben gezählt.

In Abb. 5 sind die Prozentgehalte des extrahierbaren, radioaktiven Materials gegen die Laufstrecke aufgetragen. Die DC-Auftrennung erfolgte sowohl mit Fließmittel I (Abb. 5.a) als auch mit Fließmittel II (Abb. 5.b). Ferner ist in beiden Abbildungen die Lage des DMT- und NMT-Flecks eingezeichnet.

Wie insbesondere aus der Abb. 5 b zu ersehen ist, fallen der Maximalwert der über die gesamte Laufstrecke extrahierten, radioaktiven Substanzen und die Fleckhöhe von DMT im DC zusammen, so daß die Identität des enzymatisch entstandenen, radiochemisch meßbaren Inkubationsprodukts DMT weitgehend als gesichert angesehen werden konnte.

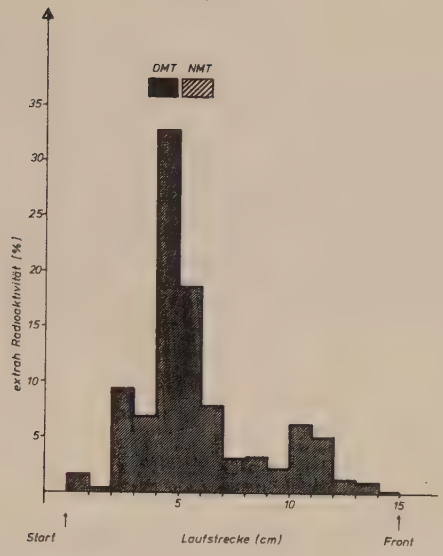


Abb. 5a: Fließmittel I:
n-Butanol/Essigsäure/Wasser (80:20:20)

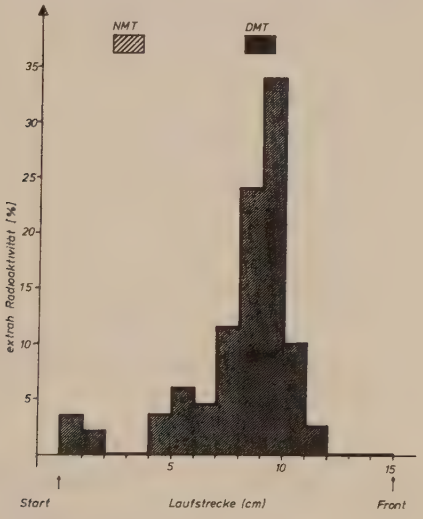


Abb. 5b: Fließmittel II:
Chloroform/Methanol/NH_3 (25 %, wäßr. Lösg.) (60:40:2)

Abb. 5: Verteilung der extrahierbaren, radioaktiven Substanzen über die gesamte Laufstrecke aus den Dünnschicht-Chromatogrammen einer biologischen Probe.
Hineinprojeziert ist die Lage der Substanzflecke von NMT und DMT.

2.2.4 Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie ist in der organischen Chemie zu einem wichtigen und exakten Analysenverfahren geworden (KAISER, 45). Gerade zur Auftrennung von Substanzen aus biologischen Proben wird sie vielfach angewendet. Wie die gaschromatographischen Bestimmungen biogener Amine von HIEMKE (36) und KAUERT (46) gezeigt hatten, lassen sich die Indole als Propionylderivate gut trennen.

2.2.4.1 Derivatisierung

Zur Propionylierung wurde das zu trennende Gemisch mit Natriumhydrogencarbonat gesättigt und unter Schütteln 3mal mit 50 µl Propionsäureanhydrid versetzt. Anschließend wurde jeweils 15 Min. geschüttelt. Die Reaktionsprodukte wurden 3mal mit je 2.0 ml Essigsäureaethylester extrahiert und die organische Phase am Rotationsverdampfer unter trockenem Luftstrom bei 25 - 30° C abgezogen. Wegen der relativ hohen Flüchtigkeit des DMT's ist die Einhaltung der Wasserbadtemperatur von besonderer Bedeutung. Der Rückstand wurde in 50 µl Acetonitril aufgenommen und 1 - 3 µl der Probe zur Gaschromatographie verwendet.

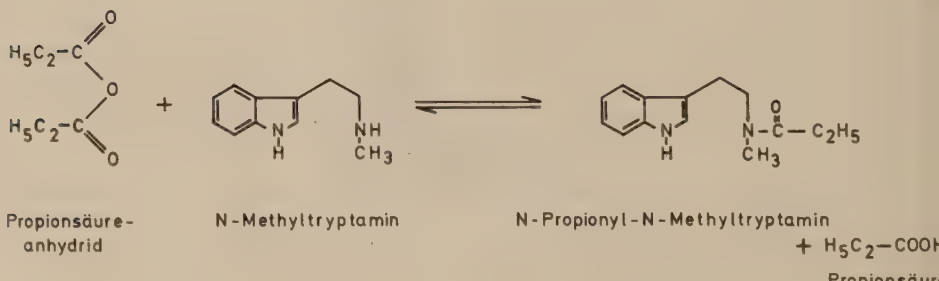


Abb. 6: Acylierung von N-Methyltryptamin durch Propionsäureanhydrid

2.2.4.2 Gaschromatographische Trennung

Als stationäre Phase eignete sich für unsere Zwecke Silicon OV-101 auf Chromosorb Q am besten. Jede der drei zu trennenden Substanzen, N-Methyltryptamin, N,N-Dimethyltryptamin und 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin (5-OCH_3-DMT) als innerer Standard konnte als einheitlicher Peak nachgewiesen werden (Abb.7a). Unter den gleichen gaschromatographischen Bedingungen gelang auch die Auftrennung des Gemisches einer biologischen Probe (Abb. 7b). Die Substanzen konnten anhand der Retentionszeit sicher identifiziert werden.

2.2.4.3 Quantitative Bestimmung

Als Auswertungsgrundlage für die quantitative Bestimmung der Substanzen wurden ihre Peakhöhen aus den Gaschromatogrammen gemessen. Durch die Zugabe einer genau dosierten Menge 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin als interner Standard konnte die Konzentration des gebildeten DMT's anhand folgender Gleichung berechnet werden (KAISER, 45).

$$M_x = \frac{h_x \cdot M_s}{h_s} \times \frac{1}{K}$$

M_x = Menge der zu bestimmenden Substanz x
h_x = Peakhöhe der zu bestimmenden Substanz x
M_s = Menge des zugesetzten Standards
h_s = Peakhöhe des Standards
K = Korrekturfaktor ("response - Faktor")

In den Korrekturfaktor gehen die substanzspezifischen Eigenschaften des Detektorsignals ein wie die unterschiedliche Ionisierbarkeit oder abweichende Peakbreiten. Er läßt sich ermitteln, indem die Peakhöhe der zu bestimmenden Substanz durch die Peakhöhe des Standards dividiert wird:

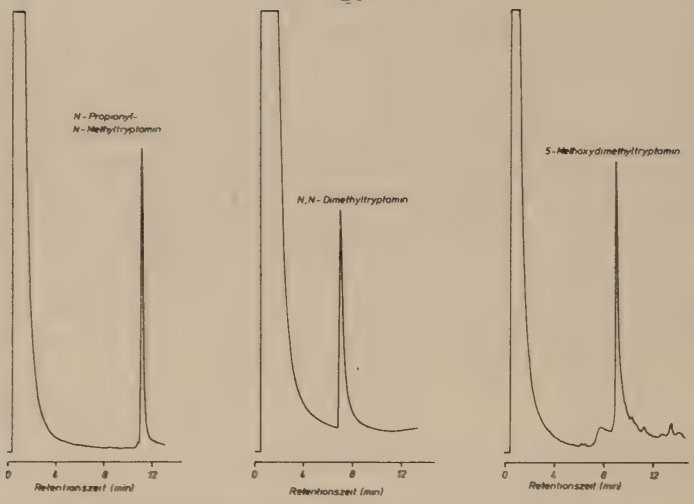


Abb. 7a: Gaschromatographischer Nachweis von:
N-Propionyl-N-Methyltryptamin,
N,N-Dimethyltryptamin und
5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin

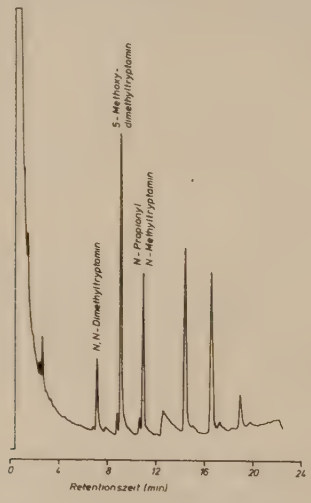


Abb. 7b: Gaschromatographische Auftrennung einer biologischen Probe

Gaschromatographie-Bedingungen

Stationäre Phase: Silicon OV-101, 5% auf Chromosorb Q 80/100 mesh; Säule: Glas, 1,5 m lang, 3 mm Innendurchmesser; Trägergas: 50 ml N_2/min; Detektorgase: 30 ml H_2/min und 240 ml synthetische Luft/min; Injektortemperatur: 270° C; Ofentemperatur: 120-260° C, 10° C Temperaturerhöhung/min; Detektortemperatur: 300° C; Elektrometereinstellung: 10^3 x1; Papiervorschub: 2,5 Inches/min;

$$K = \frac{H_x}{H_s}$$

H_x = Peakhöhe der Substanz
H_s = Peakhöhe des Standards

Bei Verwendung von Silicon OV-101 als stationärer Phase und 5-OCH_3-DMT als interner Standard wurden die folgenden Korrekturfaktoren bestimmt:

N-Propionyl-N-Methyltryptamin	2,86
N,N-Dimethyltryptamin	1,18

2.2.4.4 Standardsubstanz

Die Standardsubstanz 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin, die wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit N,N-Dimethyltryptamin als interne Bezugsgröße diente, wurde der zu bestimmenden Probe bereits vor Beginn der Aufarbeitung zugesetzt.

Als physiologische Substanz kommt sie in Geweben, Hirn (40), Zirbeldrüse und Hypothalamus (30, 70) und in Körperflüssigkeiten, Blut und Urin vom Menschen (27) vor. Ihre enzymatische Bildung über eine entsprechende Methylierung aus den Vorstufen 5-Methoxytryptamin (65), 5-Methoxy-N-Methyltryptamin (65, 74) und 5-Hydroxy-N,N-Dimethyltryptamin (100) wurde ebenfalls beschrieben.

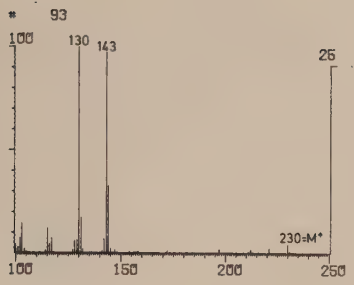
Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch bereits vorhandene Standardsubstanz im Inkubat vor dem Test bzw. ihre enzymatische Bildung während der Inkubation auszuschließen, extrahierten wir die enzymhaltige Proteinlösung je 3 x mit 1,0 ml Aethylacetat und Toluol. Nach dieser Vorbehandlung ließen sich im Extrakt weder 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin noch eine ihrer Metaboliten im Nanogramm-Bereich nachweisen.

2.2.5 Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC - MS)

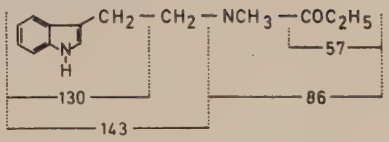
Durch die Gaschromatographie wird zwar eine ausgezeichnete Trennung des Substanzgemisches erreicht, zur Charakterisierung der Substanzen steht jedoch nur die Retentionszeit zur Verfügung. Um die eingangs aufgezeigte Unsicherheit, mit der die Untersucher bei der Bestimmung der durch N-Methyltransferasen katalysierten Entstehung dimethylierter Indole zu kämpfen hatten, möglichst vollständig auszuschalten, mußten andere analytische Verfahren zur weiteren Identifizierung in die Untersuchungen einbezogen werden. Da unser Labor mit einem kombinierten GC-MS-System, FINNIGAN 4000 mit Datenverarbeitung, ausgerüstet ist, nutzten wir die Möglichkeiten dieses besonders empfindlichen Verfahrens, um zu einer eindeutigen Abklärung der Substanzidentität zu gelangen. Neben rein qualitativen Aussagen sollte uns die GC-MS-Methode befähigen, exakte quantitative Bestimmungen durchzuführen.

Die Erfahrungen aus den gaschromatographischen Analysen kamen uns bei den weiteren Arbeiten zugute. Alle Messungen wurden mit einer 2,0 m langen OV-101 Säule (2 mm Innendurchmesser) als stationärer Phase vorgenommen. Wesentlich kürzere Bestimmungszeiten ergaben sich dadurch, daß das Temperaturprogramm für den Gaschromatographen zugunsten einer isothermen Ofentemperatur von 165° C abgewandelt wurde. Ionisiert wurde durch Elektronenstoß (EI) bei 70 eV Energie, 350 µA Elektronenionisationsstrom und einer Temperatur für Separator und Quelle von 250° C. Für die übrigen GC-MS-Daten wird auf Abb. 8 verwiesen, in der die Massenspektren von DMT, 5-OCH_3-DMT und N-Propionyl-N-Methyltryptamin mit entsprechend zugeordneten Molekülfragmenten dargestellt sind.

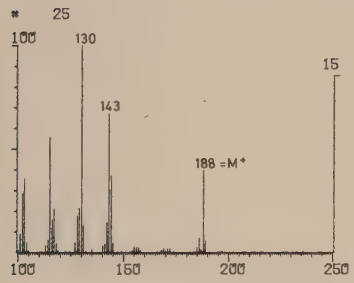
Die rekonstruierten Massenchromatogramme für den jeweiligen Molekülpeak dieser drei Substanzen aus einem GC-Lauf im Massenbereich 100-250 pro Scan sind in Abb. 9 zusammengefaßt; Abb.10 zeigt das Massenchromatogramm des DMT's (M^+: 130, 143, 188) aus einer biologischen Probe.



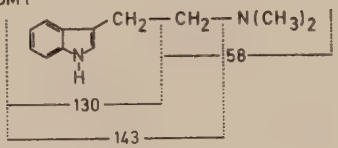
N-Propionyl-
N-Methyltryptamin



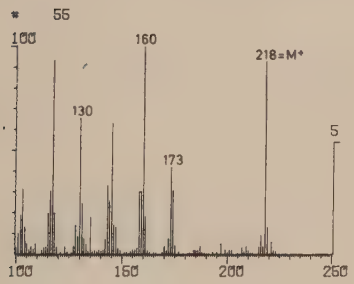
MG = 230



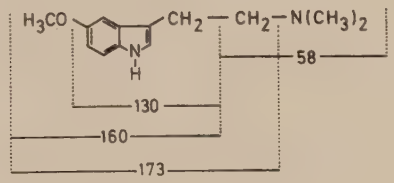
DMT



MG = 188



5-OCH_3-DMT



MG = 218

Abb. 8: Massenspektren von:

N-Propionyl-N-Methyltryptamin
N,N-Dimethyltryptamin und
5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin
M^+ = Molekülion

GC-MS-Bedingungen:

Stationäre Phase: Silicon OV-101, 3% auf Chromosorb Q 80/100 mesh;
Säule: 2,0 m lang, 2 mm Innendurchmesser; Trägergas: 20 ml He/min;
Injektortemperatur: 250° C; Ofentemperatur: 165° C (isotherm);
Separatortemperatur: 250° C; Quellentemperatur: 250° C;
Elektronenenergie: 70 eV; Elektronenionisationsstrom: 350 µA;

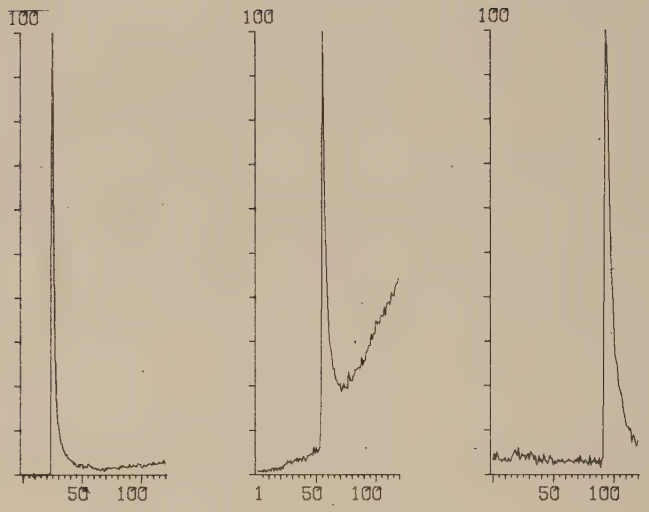


Abb. 9: Rekonstruierte Massenchromatogramme für den jeweiligen Molekülpeak von N,N-Dimethyltryptamin, N-Propionyl-N-Methyltryptamin und 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin aus einem GC-Lauf im Massenbereich 100 - 250 pro Scan.

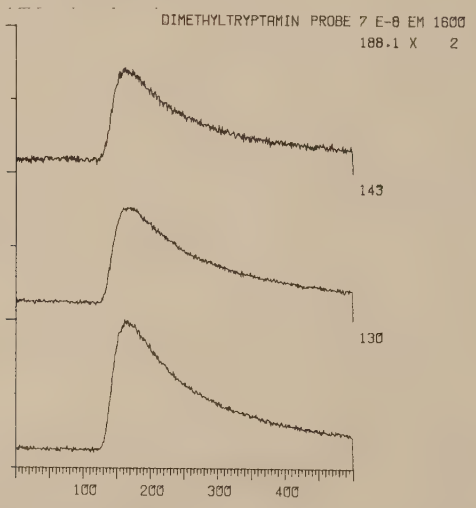


Abb. 10: Massenchromatogramm für N,N-Dimethyltryptamin (M^+ : 130, 143, 188) aus einer biologischen Probe

Die quantitative Bestimmung des N,N-Dimethyltryptamins wurde wieder mittels des internen Standards 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin durchgeführt. Eine Auswertung erfolgte über die Bildung des Flächenverhältnisses aus den Massenchromatogrammen der Molekülpeaks von DMT und 5-OCH_3-DMT.

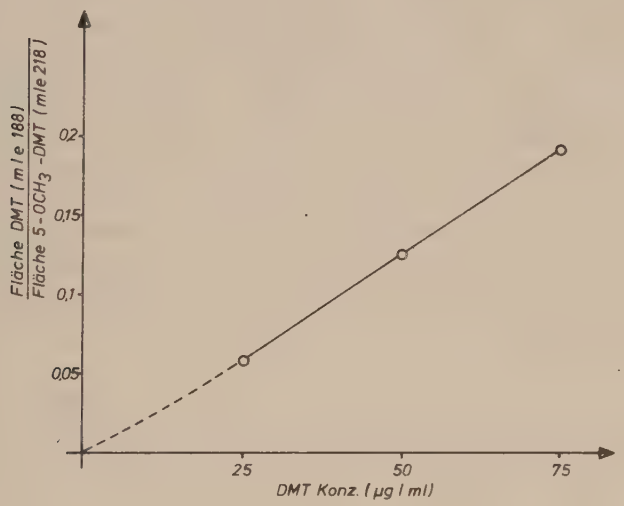


Abb. 11: Eichgerade zur quantitativen Bestimmung von N,N-Dimethyltryptamin in einer biologischen Probe

Zur Ermittlung einer Eichgeraden wurden von den 3 DMT Konzentrationen 25, 50 und 75 ng/µl, die je 50 ng/µl 5-OCH_3-DMT enthielten, die Chromatogramme der Massen 188 und 218 aufgenommen, und die Flächen integriert. In Abb. 11 ist das Verhältnis aus den Flächenarealen gegen die DMT-Konzentration aufgetragen. Sie zeigt, daß die Eichgerade im Bereich 25 - 75 ng/ul DMT linear verläuft. Bei den einzelnen Proben wurde vor der quantitativen Bestimmung soweit möglich darauf geachtet, daß die Konzentration an zu bestimmendem DMT im linearen Bereich des vermessenen Konzentrationsintervalls erwartet wurde.

2.3 Isolation der Indol-N-methyltransferase

2.3.1 Homogenisation

Die durch Halsmarkdurchtrennung getöteten Tiere ließen wir kurz ausbluten; danach wurden die Lungen am Hilus herauspräpariert,von Trachea- und Blutgefäßresten befreit, mit eiskaltem Aq. bidest. abgespült, gewogen und in O,o2 M Kaliumphoshat-Puffer (pH 7,8) unter Eiskühlung homogenisiert (3 Volumenteile Puffer auf 1 Gewichtsteil Gewebe). Alle weiteren Arbeiten wurden im Kühllabor bei 4^{O} C Temperatur durchgeführt.

Zur Homogenisation verwendeten wir einmal einen Glashomogenisator nach Potter-Eveljhem, dessen Stempel mit maximal 1 500 U/Min. rotierte und dreimal langsam unter Einschaltung von Pausen auf und ab bewegt wurde. Ein gründlicherer Gewebeaufschluß des Organmaterials wurde erreicht, indem der Rotor eines Ultra-Turrax-Gerätes bei voller Umdrehung (10 000 U/Min.) 3 x für 5 Sek. in das zu homogenisierende Gut getaucht wurde. Das Homogenat wurde anschließend 50 Min. bei 19 100 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und weiterverwandt, der Niederschlag wurde verworfen.

2.3.2 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Die N-Methyltransferase wurde nach einer modifizierten Methode von MANDEL et al. (64) in einem Kaliumphosphat-Puffer, ph 7,8, durch Zugabe einer bei 4^{O} C gesättigten, mit 1 N NaOH neutralisierten Ammoniumsulfat-Lösung gefällt.

Zu 11 Teilen Überstand wurden 9 Teile Ammoniumsulfat-Lösung (= 45 % Sättigung) gegeben und ca. 20 Min. lang gerührt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert (50 Min. bei 19 100 g), verworfen und die überstehende Lösung mit weiterer Ammoniumsulfat-Lösung auf 55 % Sättigung gebracht. Dazu wurden zu 9 Teilen Überstand 4 Teile Ammoniumsulfat-Lösung gegeben, wiederum 20 Min. gerührt und 50 Min. bei 19 100 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, der resultierende Niederschlag (= 55 % Fällung) wurde in 20 Teilen Aq. bidest. gelöst und zur weiteren Enzymaufbereitung verwendet.

2.3.3 Proteinbestimmung

Wir bestimmten den Proteingehalt mit dem Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz nach der Methode von LOWRY (60). Die Konzentration wurde mit Hilfe einer mit Rinderserum-Albumin aufgestellten Eichkurve ermittelt. Gemessen wurden die Extinktionswerte bei 750 nm; diese Bestimmung wurde für jeden Versuch neu durchgeführt. Zwischen den von der Eichkurve erfaßten Konzentrations- und Extinktionsbereichen ergab sich ein linearer Zusammenhang. Für diesen Kurvenabschnitt wurden die Gleichungen der Regressionsgeraden errechnet und zur Bestimmung des Proteingehaltes verwendet.

2.3.4 Dialyse

Die N-Methyltransferase wurde im Visking-Dialyse-Schlauch (Fa. SERVA: 15 - 20 Å Porenweite ≙ 10-20 000 Dalton) über 24 Stunden gegen 0,005 M Kaliumphosphat-Puffer dialysiert. Bezogen auf die Salzkonzentration im Ammoniumsulfat-Niederschlag entsprach das Konzentrationsgefälle einer ungefähren Verdünnung von 1 : 800. Die Badflüssigkeit wurde alle 4 Std. gewechselt.

2.3.5 Sephadex - Auftrennung

Die dialysierte Probe wurde mittels Gelchromatographie aufgetrennt. Als Säulenmaterial verwendeten wir das Sephadex-Gel G-100 mit einem Fraktionierbereich zwischen 4 000 und 150 000 Dalton. Das Format der Chromatographiesäule wurde so gewählt,daß ein Verhältnis von Durchmesser zur Höhe von 1 : 10 resultierte.

Das Gel wurde vor der Trennung mit dem ebenfalls als Elutionsmittel dienenden 0,02M Kaliumphosphat-Puffer äquilibriert. Als Probenvolumen wurden zwischen 2,0 und 5,0 ml Lösung entsprechend einer Proteinmenge von ca. 15 bis 40 mg aufgetragen.

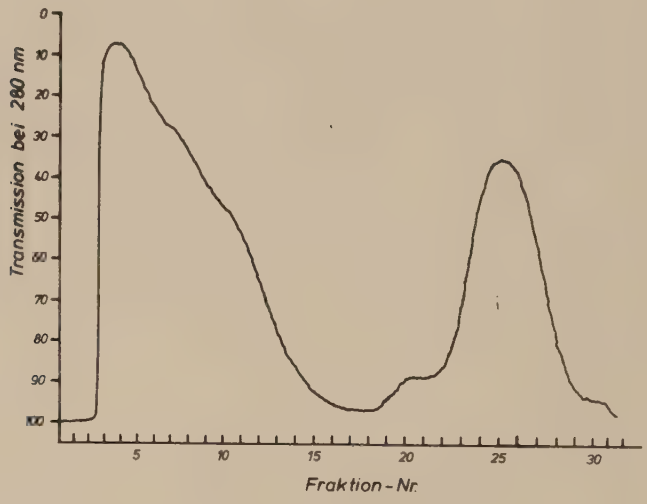


Abb. 12: Auftrennung einer Proteinprobe über Sephadex G-100

Das Eluat wurde mit einem automatisch arbeitenden Fraktionssammler (Fa. GILSON MEDICAL) in Fraktionen von 5,5 ml aufgefangen. Bei konstant gehaltener Durchflußgeschwindigkeit wurde der Fraktioniervorgang über die Transmission des Säuleneluats bei 280 nm in einer Photozelle gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet (Abb. 12). Die N-Methyltransferase wurde in den Fraktionen 17 - 26 mit einem Maximum bei Fraktion 24 eluiert. Abb. 13 veranschaulicht den Elutionsvorgang der aktivsten Fraktionen; das Aktivitätsmaximum ist gleich 100 % gesetzt.

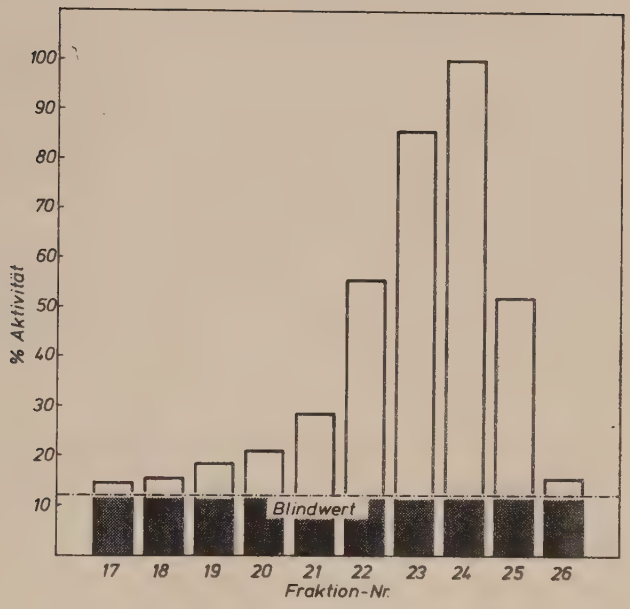


Abb. 13: Verteilung der Enzymaktivität nach Auftrennung einer Proteinprobe über Sephadex G-100

Die Proben Nr. 23 und 24 wurden vereint und als "Enzym-Stammlösung" für die Ermittlung der K_m-Werte sowie für die Untersuchungen über die Hemmwirkung von Arzneimitteln gebraucht. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Proteinlösung eingefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophylisat konnte anschließend ca. 6 Wochen ohne Aktivitätsverlust bei - 24° C aufbewahrt werden.

2.3.6 Verteilung der Enzymaktivität

Während der Isolierung des Enzyms wurden sowohl undialysierte als auch dialysierte Proben aus dem Gesamthomogenat, Überstand und Niederschlag der Ammoniumsulfat-Fällungen und aus den einzelnen Fraktionen der Sephadex-Auftrennung zur Aktivitätsbestimmung entnommen, um das Vorhandensein und die Menge an Indol-N-Methyltransferase (INMT) festzustellen. Die zu untersuchende Probe wurde bei 37° C, pH 7,8 und 3 verschiedenen Substratkonzentrationen für N-Methyltryptamin sowie einer konstanten S-Adenosylmethionin-Konzentration über 60 Min. inkubiert (siehe dort).

Als Reinheitskriterium der Enzymproben wurde die spezifische Aktivität bestimmt. Aus der anfangs gemessenen Enzymaktivität in n Mol/h x ml Enzymlösung ergibt sich nach Division durch die Proteinkonzentration die spezifische Aktivität in nMol DMT/h/mg Protein. Für die gesamte Aufarbeitung ließ sich ein Anreicherungsfaktor von 17,9 bezogen auf die spezifische Aktivität im Gesamthomogenat errechnen (Tab. 1). Die Ausbeute an Enzym betrug 10,3 % der Gesamtproteinmenge im Homogenat.

Enzym-quelle	Tot.Prot. [mg]	Spez.Akt. [U/mg]	Tot.Akt. [U]	Ausbeute [%]
Homogenat	1 170,0	1,335	1 562,0	100
45 - 55 % Fraktion	89,2	4,395	392,0	25,1
Sephadex G - 100	6,7	23,90	160,1	10,3

Tab. 1: Verteilung der Enzymaktivität nach Aufarbeitung einer Probe aus Kaninchenlunge

Probe	Zählrate vor Dialyse [cpm]	Zählrate nach Dialyse [cpm]
Homogenat	21 150	67 550
" Protein denatur.	1 740	1 510
" ohne Substrat	18 300	2 250
55 % Ammon.-sulf.-Fällg.	5 850	245 000
" Protein denatur.	1 270	760
" ohne Substrat	4 620	89

Tab. 2: Vergleich der Enzymaktivität zwischen undialysierten und dialysierten Proteinproben

Tab. 2 gibt einen Überblick über die Aktivitätsunterschiede, die bei Verwendung undialysierter und dialysierter Proben im Vergleich mit den Standardwerten für die Indol-N-Methyltransferase gemessen wurden. Während die Zählraten bei Einsatz des Gesamthomogenats vor und nach der Dialyse um Faktor 3,2 differierten, wichen die Ergebnisse, die mit der 55%igen Ammoniumsulfat-Fällung erzielt wurden, wesentlich stärker voneinander ab:

Undialysiert erbrachte die Probe einen Wert, der ca. 4mal höher lag als der Blindwert mit denaturiertem Protein; nach der Dialyse zeigte sich für die gleiche Probe eine intensive Aktivitätszunahme um Faktor 42. Mit beiden Proben ließ sich demnach eine Steigerung der Enzymaktivität durch Dialyse feststellen.

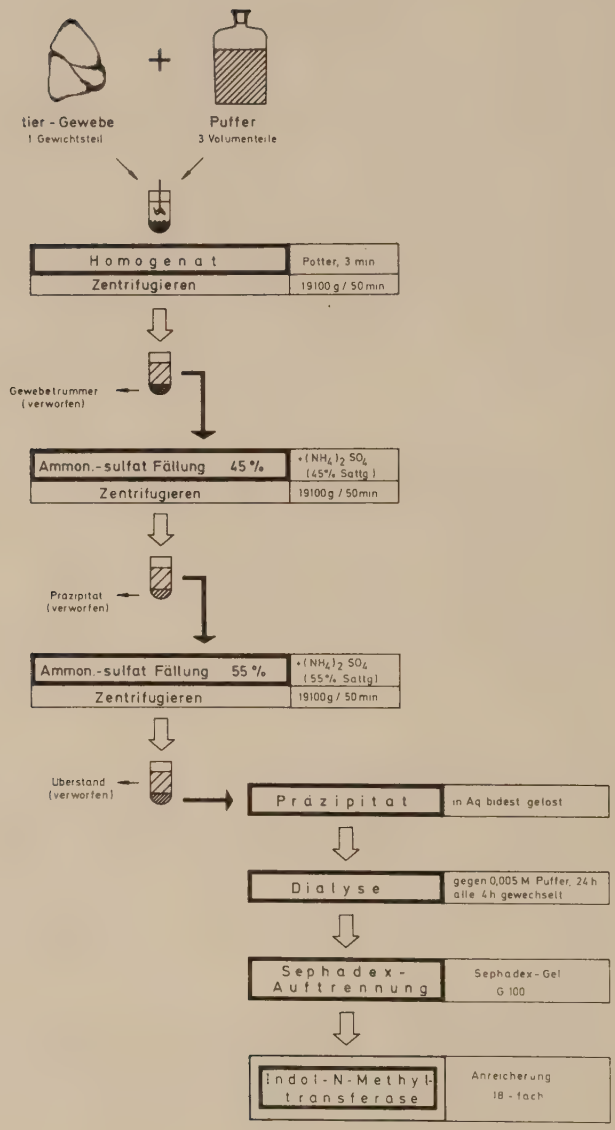


Abb. 14: Schema zur Aufbereitung und Isolierung der Indol-N-Methyltransferase

2.4 Der Enzym-Test:

2.4.1 Inkubation:

Die Aktivität des gereinigten Enzyms sowie aller Proben, die zu verschiedenen Zeiten der Aufarbeitung entnommen wurden, bestimmten wir in Anlehnung an die von AXELROD (3) publizierte Methode grundsätzlich nach folgendem Ansatz:

100 µl Enzym - Lösung
100 µl 0,02 M Kaliumphosphat - Puffer
100 µl SAM - Lösung (verschied. Konz.)
100 µl NMT - Lösung (verschied. Konz.)
100 µl Arzneimittel - Lösung bzw. Aq. bidest.

Gesamtvolumen: 500 µl, pH 7,8;

Bei der Herstellung der Inkubationsproben wurde so verfahren, daß die Reagenzgläser (15 ml Zentrifugengläser) nacheinander mit Puffer, NMT- und SAM-Lösung unter Eiskühlung beschickt wurden. Die Teströhrchen wurden dann so schnell wie möglich in ein Wasserbad von 37° C überführt, und die Inkubation nach einer Aufwärmzeit von 5 Min. unter Zusatz der enzymhaltigen Lösung gestartet. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 90 Min.. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5 ml gesättigter Borax-Lösung gestoppt.

Falls bei einigen Versuchen die Inkubationsbedingungen von obiger Anordnung abwichen, wurde dies an entsprechender Stelle vermerkt.

2.4.2 Extraktion des Inkubats

Da sich die Forschungsergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen bei der exakten Identifizierung des aus der Inkubation gewonnenen N,N-Dimethyltryptamins problematisch gestalten, kommt dem Extraktionsvorgang eine besondere Bedeutung zu. Nach Abbruch der Reaktion wurden die Proben 3mal mit 2,0 ml einer Mischung aus 97 Teilen Toluol und 3 Teilen Isoamylalkohol versetzt; mit diesem Gemisch, das AXELROD (3) zur Extraktion biogener Indole verwendete, läßt sich DMT quantitativ extrahieren, ein Befund, der sich bei unseren Untersuchungen bestätigte. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben 2 x 45 Sek. unter Einschaltung einer Pause geschüttelt und 3 Min. bei 900 g zentrifugiert. Die Emulsion aus organischer und wässriger Phase wurde durch kurzes Aufschütteln gebrochen und durch nochmaliges Zentrifugieren bei 900 g getrennt. Die Zählrate der letzten Fraktion des Ausschüttelungsvorgangs verhält sich zu dem cpm-Wert der ersten wie 1 : 12, d.h. fast der gesamte DMT-Gehalt findet sich bereits im ersten Extrakt. Wir konnten feststellen, daß letzten Endes nur ca. 7 % unausgeschüttelt in der wässrigen Phase zurückbleiben.

Da bei ungenügend gereinigten Enzymlösungen und bei Verwendung von Methyltetrahydrofolsäure als Methyldonator die enzymatische Bildung von Formaldehyd und Methanol als radioaktiv markierte Agentien, wie eingangs bereits erwähnt, möglich ist, kann durch zu hohe Zählraten des Inkubats das Ergebnis verfälscht werden. DOMINO (21) konnte 1976 feststellen, daß radioaktiv markierter Formaldehyd sowie ^{14}C-Methanol zu 19,0 % bzw. 10,4 % aus der wässrigen Phase in das Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch extrahiert werden. Durch Vakuumdestillation bei 22° C konnte er dann beide Substanzen nach ca. 25 Min. aus der organischen Phase entfernen. Ferner gelingt es nach DOMINO, radioaktiv markierten Formaldehyd und ^{14}C-Methanol durch Eindampfen in einem Ofen bei 80° C über 16 Std. zu entfernen, wobei jedoch infolge thermischer Labilität dimethylierter Indole ein Verlust von ca. 45 % an DMT eintritt.

Unsere Proben wurden in einem Chromatographie-Ofen mit Luftumwälzung bei 40° C über 5 Std. zur Trockene eingeengt. Wir verglichen das Verfahren mit einer Testreihe, bei der die Proben nach DOMINO am Rotationsverdampfer bei angelegtem Vakuum und 20° C abgedampft wurden. Tabelle 3 zeigt den Unterschied zwischen den im Ofen abgedampften und den im Vakuum eingeengten Proben. Setzt man die nach der Vakuumdestillation im Rückstand meßbare Radioaktivität gleich 100 %, so ergibt sich bei unserem Verfahren im Mittel ein um 5,6 % niedrigerer Wert. Unser Verfahren ist jedoch leichter zu handhaben und ermöglicht es, die kontaminierenden Substanzen zu entfernen, ohne die weitere Aufarbeitung des N,N-Dimethyltryptamins wesentlich zu gefährden.

NMT Konz. in [nM]	extrah.Radioakt. bei Vakuumdest. in [cpm]	extrah.Radioakt. bei Dest.im Ofen in [cpm]	Ausbeute [%]
10	16 650	15 800	95,8
50	35 050	33 100	94,4
150	44 550	41 500	93,1

Tab. 3: Ausbeute-Bestimmung nach der Entfernung kontaminierender Substanzen durch Vakuumdestillation und Destillation in einem Chromatographie-Ofen

Aber auch nicht umgesetztes, radioaktiv markiertes SAM in der organischen Phase könnte im Isotopentest einen zu hohen enzymatischen Umsatz vortäuschen und Anlaß zu Fehlinterpretationen geben. Verschiedene Ausschüttelungsversuche mit wässrigen SAM-Lösungen und Toluol/Isoamylalkohol (97/3) als Extraktionsmittel führten zu dem Ergebnis, daß der zuckerhaltige Methyldonator aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften nicht in die organische Phase verschleppt wird. Diese Beobachtung wird zusätzlich

dadurch kontrolliert, daß sowohl bei Inkubation in Abwesenheit des Substrates als auch bei Verwendung gekochten Enzyms (Blindwerte) keine radioaktiven Substanzen im Extrakt nachgewiesen werden können.

Das beschriebene Verfahren wurde außer für den radiochemischen Test auch für die DC-Auftrennung übernommen, jedoch wurde der Rückstand nach Abdampfen der Toluolphase in 100 ul Aethylacetat gelöst. Zur gaschromatographischen Bestimmung sowie für alle GC-MS-Untersuchungen wurden die Proben direkt im Anschluß an die Inkubation derivatisiert (siehe dort).

2.4.3 Kinetik der Indol-N-Methyltransferase

Die kinetischen Untersuchungen für die enzymatische Reaktion der Indol-N-Methyltransferase wurden mit der Enzym-Stammlösung aus der 45 - 55%igen Ammoniumsulfat-Fällung nach der Dialyse durchgeführt.

2.4.3.1 Abhängigkeit von der Enzymmenge

Zur Bestimmung der DMT Bildung in Abhängigkeit von der Proteinmenge wurden für die Inkubationsversuche folgende Bedingungen gewählt: pH 7,8, 37° C Temperatur, 90 Min. Inkubationsdauer, 0,3 µM NMT, 0,1 µM SAM und Proteinkonzentrationen von 50 - 550 µg/ml Inkubat.

Abb. 15 zeigt, daß der Umsatz mit zunehmender Enzymmenge bis zu 350 µg inkubiertem Eiweiß linear ansteigt und bei ca. 550 µg eine Sättigung erreicht.

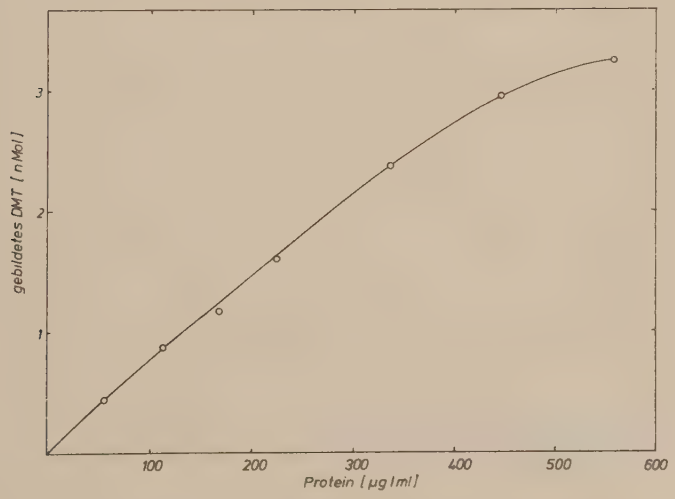


Abb. 15: Abhängigkeit der Indol-N-Methyltransferase-Aktivität von der Proteinkonzentration

2.4.3.2 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Zur Ermittlung des Einflusses der Inkubationszeit auf die N-Methylierung von NMT mußte auf die exakte Durchführung der Inkubation, insbesondere auf die strikte Einhaltung der Vorwärmzeit geachtet werden.

Bei einer Proteinkonzentration von 446 µg und 0,15 µM für NMT sowie 0,05 µM für SAM wurde die Reaktion über einen Zeitraum von 0 - 180 Min. beobachtet und zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen.

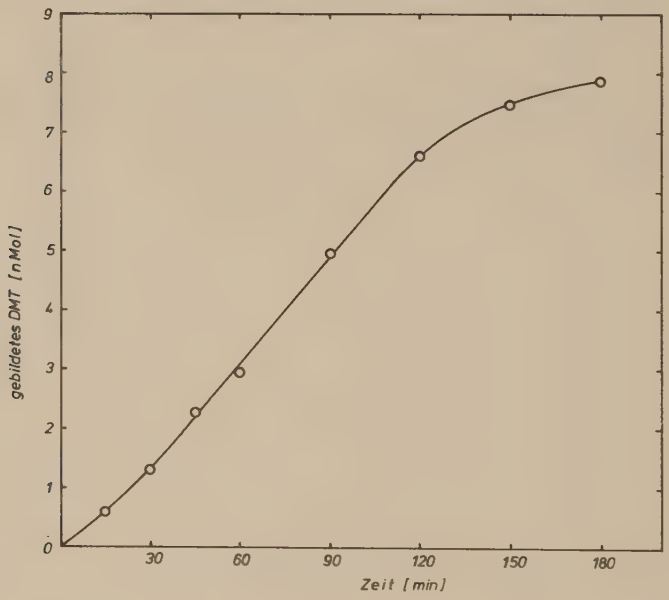


Abb. 16: Abhängigkeit der Indol-N-Methyltransferase-Aktivität von der Inkubationszeit

Bis zu einer Inkubationsdauer von 90 Min. konnte eine lineare Abhängigkeit des Umsatzes von der Zeit gefunden werden (Abb. 16). Nach ca. 180 Min. ließ sich keine weitere Aktivitätszunahme feststellen.

2.4.3.3 Einfluß des pH-Wertes auf die N-Methylierung

Aus Abb. 17 ist die Abhängigkeit der N-Methyltransferase-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten (pH 6,8 - 8,0) ersichtlich. Alle Reaktionen wurden im 0,02 M Puffersystem K_2HPO_4/KH_2PO_4 bei einer Proteinkonzentration von 446 µg, 0,3 µM NMT und 0,1 µM SAM durchgeführt. Die pH Angaben beziehen sich auf das aktuelle pH im Inkubationsansatz. Das pH Optimum für die enzymatische Methylierung von NMT liegt bei pH 7,8. Dies stimmt gut mit Ergebnissen von AXELROD (3) und MANDEL et al. (64) überein, die bei ihren Untersuchungen mit INMT aus Kaninchenlunge eine maximale Umsetzung bei pH 7,9 fanden.

Eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Inkubationsansatz durch Zusatz von 0,3 M NaCl-Lösung führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Aktivität, die unter Standardbedingungen erzielt wurde.

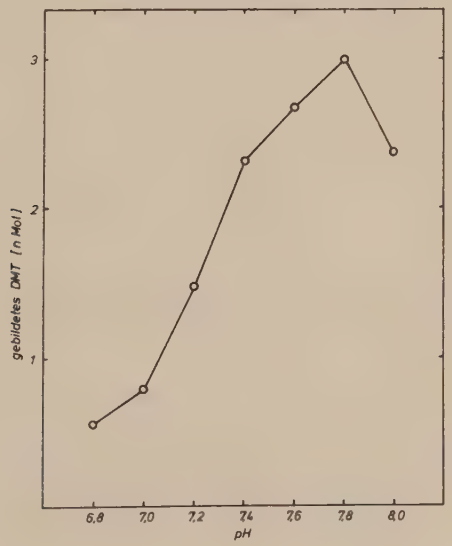


Abb. 17: Einfluß des pH-Wertes auf die N-Methylierung von N-Methyltryptamin

2.4.3.4 Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Die Messungen erfolgten bei konstanter Enzymmenge (446 µg) und wechselnden Substratkonzentrationen für NMT von 0,075 - 3,0 µM. Die SAM-Konzentration von 0,01 µM wurde nicht variiert. Die Reaktion, die bei pH 7,8 und bei einer Temperatur von 37° C stattfand, wurde nach 90 Min. beendet.

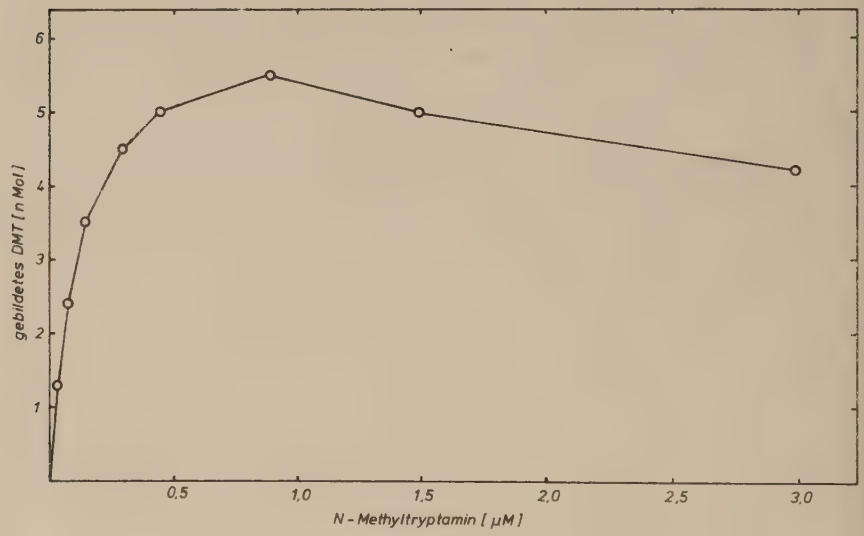


Abb. 18: Abhängigkeit der Indol-N-Methyltransferase-Aktivität von der Substratkonzentration (NMT)

Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt. Bis zu einer Substrat-Konzentration von ca. 0,8 µM NMT war ein Anstieg der Umsatzrate nachweisbar, der bis zu 0,03 µM sehr steil verlief. Nach Überschreiten der optimalen Substrat-Konzentration zeigte sich eine Substrathemmung.

2.4.3.5 Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten für die enzymatische Bildung von DMT wurde mit der über Sephadex gereinigten Enzymfraktion vorgenommen. Die Untersuchungen erfolgten im linearen Bereich der Zeit- und Proteinkurven: Die Reaktion wurde mit 67 µg Enzym bei pH 7,8 und einer Temperatur von 37° C durchgeführt und nach 60 Min. gestoppt.

Bei einer steigenden Konzentration an NMT von 10 bis 300 nMol und einer konstanten SAM-Konzentration von 15,5 nMol pro Inkubat wurde die Enzymaktivität gemessen. Zur Ermittlung des K_m-Wertes für NMT wurden die Meßergebnisse nach LINEWEAVER und BURK (58) neben der Substratsättigungskurve in ein entsprechendes Diagramm eingezeichnet (= Erstauftragung), d.h. die aus dieser Kurve erhaltenen 1/V-Werte wurden gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 19). Der K_m-Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse. Der Ordinatenschnittpunkt zeigt den $1/V_{max.}$-Wert an, die Steigung ist gleich $K_m/V_{max.}$.

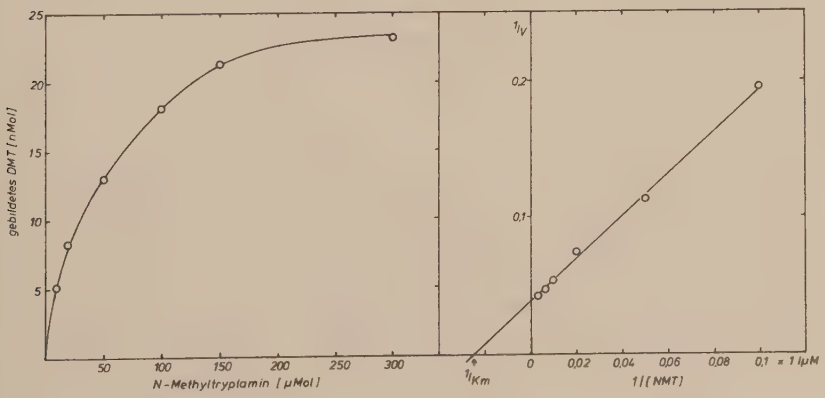


Abb. 19: Substratsättigungskurve und reziproke Darstellung der Daten mit N-Methyltryptamin als variablem Substrat

Die Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen, konstanten SAM-Konzentrationen gegen steigende Mengen NMT ist in Abb. 20 wiedergegeben. Mit Zunahme der SAM-Konzentrationen wurde auch eine Zunahme der Initialgeschwindigkeiten beobachtet.

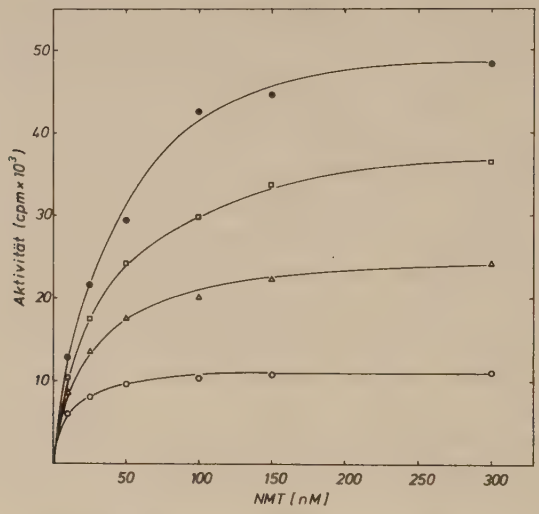


Abb. 20: Initialgeschwindigkeiten mit N-Methyltryptamin als variiertem Substrat
SAM-Konzentrationen: ●—● 25 µM
□—□ 12,5 µM
△—△ 5 µM
○—○ 2 µM

Die Daten wurden ebenfalls in einem Lineweaver-Burk Diagramm markiert (Abb. 21a); auch diese Zeichnung läßt erkennen, daß die Maximalgeschwindigkeiten mit der Zunahme des konstant gehaltenen Substrats ansteigen. Zur Bestimmung des K_m-Wertes für das zweite Substrat SAM wurden die Werte der Lineweaver-Burk Darstellung nach LAIDLER und BUNTING transformiert (51). Diese Zweitauftragung ist in die Erstauftragung eingefügt (Abb 21b).

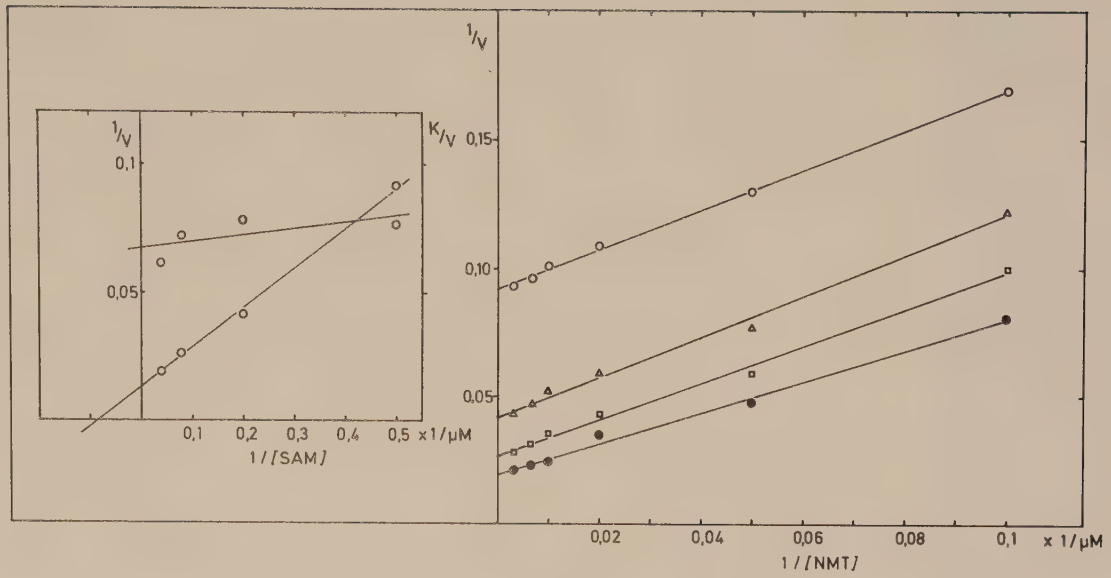


Abb. 21: Reziproke Darstellung von Initialgeschwindigkeiten mit N-Methyltryptamin als variablem Substrat
SAM-Konzentrationen: ●—● 25 µM
□—□ 12,5 µM
△—△ 5 µM
○—○ 2 µM
In das Lineweaver-Burk-Diagramm ist die Zweitauftragung nach Laidler und Bunting eingefügt.

Abb. 22 verdeutlicht das Schema zur Ermittlung der interessierenden Konstanten. Danach werden einmal die Ordinatenabschnitte $1/V = 1/V_{app.}$ aus der Lineweaver-Burk Darstellung gegen die reziproke Konzentration des nicht variierten Substrats aufgetragen (Abb. 22a); die Steigungen $K/V = K_{app.}/V_{app.}$ der Geraden der Erstauftragung werden gegen die reziproke Konzentration des konstant gehaltenen Substrats in ein zweites Diagramm eingezeichnet (Abb. 22b).

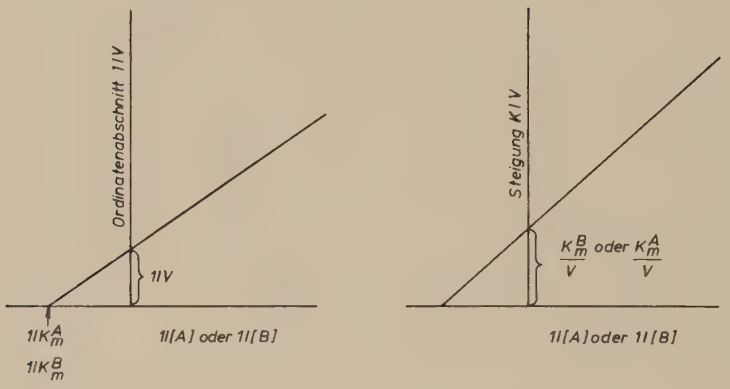


Abb. 22: Schema zur Sekundärauftragung der Steigungen und Ordinatenabschnitte nach Laidler und Bunting

Aus der linken Abbildung kann man $1/K_m$ direkt bestimmen, aus der rechten gewinnt man den K_m-Wert aus dem Quotienten $K_m/V:1/V$. Die gesuchten Größen 1/V und K_m/V ergeben sich aus den Schnittpunkten der beiden Geraden mit den jeweiligen Ordinaten. Diese Doppelermittlung ist zeitaufwendig; sie liefert aber im Endeffekt ein ausgewogeneres Ergebnis.

Für alle in dieser Arbeit dargestellten Kurven wurden, wie bereits bei der Proteinbestimmung, die Regressionsgleichungen I. Grades errechnet und der Regressionskoeffizient bestimmt. Die damit ermittelten K_m-Werte sind in Tab. 4 aufgeführt und einigen Daten aus der Literatur gegenübergestellt. Meist wird auf eine Ermittlung des K_m-Wertes für SAM verzichtet.

	variiertes Substrat K_m-Wert [M]	
Untersucher	SAM	NMT
BORCHARDT, R. T. (13)	$5{,}4 \times 10^{-5}$	---
DOMINO, E. F. (20)	---	$1{,}5 \times 10^{-4}$
KRAUSE, R. R. et al. (47)	$0{,}9 \times 10^{-5}$ $1{,}6 \times 10^{-5}$	$2{,}4 \times 10^{-4}$ $2{,}0 \times 10^{-4}$
MANDEL, L. R. et al. (64)	---	$5{,}0 \times 10^{-5}$
MANDEL, L. R. (61)	---	$5{,}0 \times 10^{-5}$
LIN, L. R. et al. (54)	---	$0{,}7 \times 10^{-4}$
SAAVEDRA, J. M. et al. (89)	$5{,}1 \times 10^{-5}$	$3{,}7 \times 10^{-5}$
eigene Untersuchungen	$1{,}2 \times 10^{-5}$	$4{,}0 \times 10^{-5}$

Tab. 4: Übersicht über K_m-Werte für NMT und SAM aus der Literatur

Aus den Abb. 19 - 21 geht hervor, daß die Größe des K_m-Wertes für ein Substrat von der Konzentration des anderen abhängig ist. Die K_m-Werte der beiden Substrate stehen in einem bestimmten Verhältnis zueinander: Die SAM-Konzentration verhält sich zur NMT-Konzentration wie 1 : 3,3. Für die weiteren Versuche wurde nur die NMT-Konzentration variiert, SAM wurde dem Inkubationsgemisch unter Berücksichtigung des K_m-Verhältnisses in einer mittleren Konzentration zugesetzt.

Die Frage nach einer exakten Bestimmung der K_m-Werte für die Substrate der Indol-N-Methyltransferase ist untrennbar mit den Problemen der Aufarbeitung verbunden. Eigene Untersuchungen ergaben, daß der K_m-Wert von der Qualität der Enzymquelle und der Reinheit der benutzten Proteinlösung abhängt und mit jedem Reinigungsschritt kleiner wird (= wachsende Spezifität). Die aktivste Fraktion der Sephadex-Auftrennung wies im Vergleich zur 55 % Fraktion der Ammoniumsulfat-Fällung eine Abnahme des K_m-Wertes um den Faktor 2,7 auf. Aus diesem Grund ist es schwierig, die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen miteinander zu vergleichen, da die spezifische Aktivität bei den einzelnen Autoren unterschiedlich war. So verwendeten z. B. KRAUSE und DOMINO (47), die in ihrer Arbeit K_m-Werte für NMT und SAM angeben, für ihre Bestimmungen den dialysierten Überstand des Homogenats als Enzymquelle.

Der von uns ermittelte K_m-Wert für NMT entspricht am ehesten dem Ergebnis von MANDEL (61), der das Enzym über Sephadex G-150 und DEAE Sephadex A - 50 reinigte, und dessen Methode für die vorliegende Arbeit modifiziert wurde.

2.5 Untersuchungen über den Einfluß psychotroper Substanzen auf die katalytische Aktivität der Indol-N-Methyltransferase

Nach Erarbeitung der optimalen enzymatischen Reaktionsbedingungen konzentrierten sich unsere Bemühungen auf die Beantwortung folgender Fragen:

1. Ist die von uns erarbeitete Versuchanordnung, insbesondere das biochemisch-analytische Verfahren, als in-vitro-Test ausreichend geeignet, routinemäßige Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung des Methylierungsvorgangs durchzuführen?

2. Üben ausgewählte Psychopharmaka verschiedener Stoffklassen einen hemmenden oder aktivierenden Einfluß auf die Reaktion aus, und können die Ergebnisse unter chemischen oder klinischen Gesichtspunkten diskutiert werden?

Dabei würde es den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigen, wollte man ein repräsentatives Urteil über eine möglichst große Anzahl von Arzneistoffen erwarten. Die Ermittlung eines umfassenden Spektrums von Arzneimitteln unter ganz speziellen Fragestellungen wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen.

2.5.1 Charakterisierung der Substanzen:

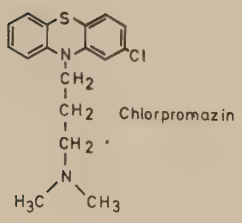
Unserer Auswahl der einzelnen Testsubstanzen liegt das Einteilungsprinzip der Psychopharmaka von DELAY (18) zugrunde, das die psychotropen Wirkstoffe zunächst nach klinischen Gesichtspunkten ordnet und erst in zweiter Linie ihre chemische Struktur in die Klassifizierung einbezieht.

Aus der Gruppe der stark wirksamen Neuroleptika wählten wir Pharmaka aus, deren klinischer Effekt in einer stark antipsychotisch wirksamen Beeinflussung schizophrener Prozesse liegt: Chlorpromazin, Oxypertin, Perphenazin und Trifluperidol.

Als typische Vertreter der tricyclischen Thymoleptika wurden Amitryptilin und Imipramin zur Testung herangezogen.

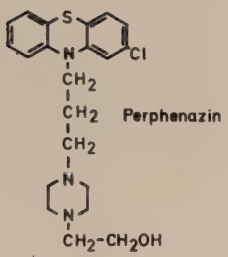
Aus dem Kreis der Psychodysleptika, Substanzen also, die in der Lage sind, Modellpsychosen hervorzurufen, welche schizophrenen Zuständen ähneln, wurden schließlich Amphetamin und N,N-Dimethyltryptamin auf eine Beeinflussung der enzymatischen Reaktion hin untersucht.

Die folgende Übersicht soll die Unterschiede in Struktur und Wirkungsprinzipien der angewandten Substanzen aufzeigen:

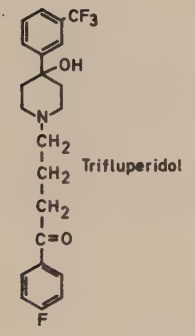


Chlorpromazin

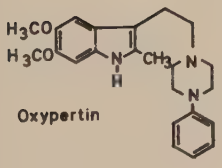
Chlorpromazin repräsentiert das Grundgerüst der tricyclischen Neuroleptika. Als Phenothiazin mit aliphatischer Seitenkette wirkt es stark dämpfend bei Erregungszuständen und antipsychotisch bei Schizophrenien.



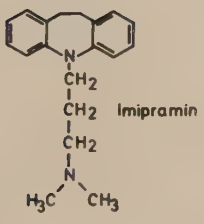
Als Vertreter der Phenothiazine, die außer einem Chloratom in 3-Stellung durch einen Piperazinylpropyl-Rest substituiert sind, zeichnet sich Perphenazin durch eine ausgeprägt antipsychotische und extrapyramidale Wirkung aus. Es findet Anwendung bei paranoid-halluzinatorischen Schizophrenien und kataton schizophrenen Zustandsbildern (HEINRICH, 34).



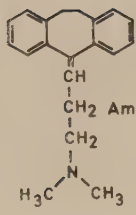
Trifluperidol, ein Butyrophenon-Derivat, wird oft bei chronischen Schizophrenien eingesetzt, die unter der Behandlung mit Phenothiazinen keine Neutralisierung der schizophrenen Symptome erkennen lassen.



Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem Grundgerüst der Tryptamine und Rauwolfia-Alkaloide wurde das Indol-Derivat des Phenylpiperazins Oxypertin aus einer Reihe indolartig strukturierter Verbindungen ausgesucht, die als Neuroleptika angewendet werden. Es eignet sich gleichermaßen bei chronischen Schizophrenien wie schizophrenen Defektzuständen.

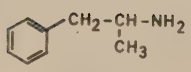


Das Iminodibenzyl-Derivat Imipramin wirkt als Thymoleptikum gegen Depressionszustände aller Art, bei höherer Dosierung besonders gegen agitierte Depressionen.



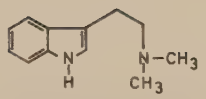
Amitryptilin

Amitryptilin, ebenfalls aus der Gruppe der Antidepressiva, gehört chemisch zu den Dibenzocycloheptadien-Derivaten und findet Verwendung hauptsächlich bei Depressionen mit ängstlichem Gepräge.



Amphetamin

Die Substanz Amphetamin hat nicht nur als Analeptikum Bedeutung, sie gilt auch als Modellsubstanz zur Auslösung typischer, psychotischer Zustände, die in ihren Auswirkungen eine gewisse Übereinstimmung mit echten Schizophrenien (Halluzinationen, Wahnsymptomen) zeigen.



N,N-Dimethyltryptamin

N,N-Dimethyltryptamin wurde in seinen Eigenschaften bereits ausführlich besprochen.

2.5.2 Wirkung der untersuchten Pharmaka und Substanzen auf die Aktivität der Indol-N-Methyltransferase

Bei der Durchführung der Hemmversuche gingen wir nach der in den einzelnen Kapiteln beschriebenen Versuchsanordnung vor. Die Inkubationsversuche erfolgten mit 67 bzw. 85 ug Protein der über Sephadex gereinigten Enzymfraktion. Die Reaktion wurde bei pH 7,8 und einer Temperatur von 37° C durchgeführt und nach 90 Min. gestoppt. Bei steigender NMT-Konzentration von 5 bis 150 nMol und einer SAM-Konzentration von 8,0 nMol, bezogen auf 0,50 ml Gesamtinkubat, wurde die Enzymaktivität radiochemisch in cpm-Werten gemessen und durch GC-MS-Bestimmungen kontrolliert.

Die Test-Substanzen, die zum Teil als Salze vorlagen, wurden in 0,02 M Kaliumphosphat-Puffer gelöst und dem Ansatz vor der Aufwärmzeit zugesetzt. Dabei fand eine meßbare pH-Verschiebung im Inkubationsgemisch nicht statt; auch die Erhöhung der Ionenkonzentration im Inkubationsmedium übte, wie unter 2.4.3.3 beschrieben, keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms aus, so daß die bloße Milieuveränderung für eine aktivierende oder hemmende Wirkung auf das Enzym nicht verantwortlich gemacht werden konnte.

Unter Berücksichtigung der mittleren Tagesdosis unterscheiden sich die ausgesuchten Substanzen allerdings erheblich in ihrer Wirkkonzentration voneinander; zwischen Trifluperidol und Chlorpromazin z. B. besteht, auf das absolute Substanzgewicht bezogen, ein Dosis-Verhältnis von 1 : 50. Deshalb wurde bewußt darauf verzichtet, einheitliche Arzneimittelmengen für die Testreihen festzulegen. Die jeweiligen Konzentrationen sind den therapeutischen Dosierungen angeglichen.

In Tabelle 5 sind die Konzentrationswerte der Substanzen für die einzelnen Inkubationsansätze aufgeführt.

Substanz	Konz. im Inkubat [ug/0,5 ml]	molare Konz. im Inkubat [M]	Hemmtyp	K_i-Wert [M]	Hemmung [%]
Amitryptilin	5 50	$3,6 \times 10^{-5}$ $3,6 \times 10^{-4}$	———	———	———
Amphetamin	1 10	$1,5 \times 10^{-4}$ $1,5 \times 10^{-4}$	———	———	———
Chlorpromazin	5 50	$3,1 \times 10^{-5}$ $3,1 \times 10^{-4}$	nicht kompetitiv	$1,4 \times 10^{-4}$ $7,4 \times 10^{-4}$	25,4 36,5
N,N-Dimethyltryptamin	5 50	$5,0 \times 10^{-5}$ $5,0 \times 10^{-4}$	nicht kompetitiv	$3,2 \times 10^{-5}$ $2,4 \times 10^{-4}$	61,3 67,1
Imipramin	5 50	$3,5 \times 10^{-5}$ $3,5 \times 10^{-4}$	nicht kompetitiv	$5,7 \times 10^{-4}$ $2,2 \times 10^{-3}$	10,8 22,8
Oxypertin	5 50	$2,6 \times 10^{-5}$ $2,6 \times 10^{-4}$	———	———	———
Perphenazin	1 10	$4,9 \times 10^{-6}$ $4,9 \times 10^{-5}$	———	———	———
Trifluperidol	1 10	$4,8 \times 10^{-6}$ $4,8 \times 10^{-5}$	nicht kompetitiv	$6,0 \times 10^{-5}$ $2,5 \times 10^{-4}$	17,1 21,4

Tab. 5: Zusammenstellung der Versuchsergebnisse aus den Hemmversuchen aller Substanzen bei variierter NMT-Konzentration. Die K_i-Werte wurden nach der Formel für nicht-kompetitive Hemmung nach DIXON und WEBB berechnet:

$$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V} - 1}$$

Aus der Gruppe der Neuroleptika übten Chlorpromazin und Trifluperidol eine deutliche Hemmwirkung auf die Aktivität des Enzyms aus. Im Lineweaver-Burk Diagramm (Abb. 23) erkennt man den nicht-kompetitiven Charakter dieser Hemmung. Die Inhibitorkonstante sowie der Prozentsatz der Hemmung sind Tab. 5 zu entnehmen.

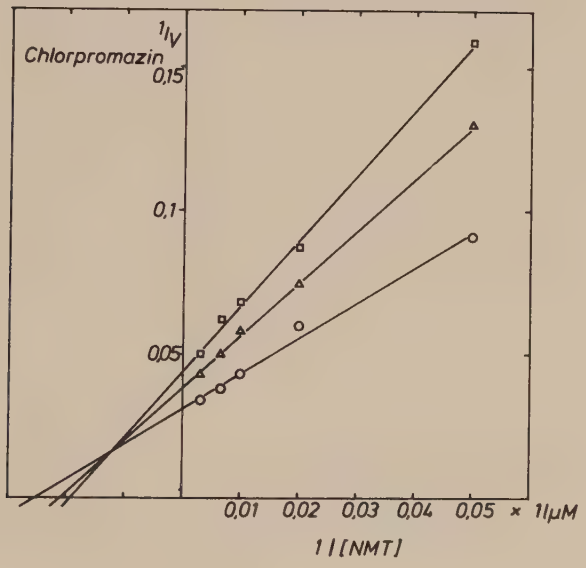


Abb. 23: Reziproke Darstellung der Substratkonzentrationskurve mit Chlorpromazin als Inhibitor
o——o ohne Inhibitor
Δ——Δ 5 ug Chlorpromazin
□——□ 50 ug Chlorpromazin im Inkubat

Übereinstimmend mit unserem Befund beschreiben AXELROD (3) und DOMINO (21) den inhibierenden Einfluß durch Chlorpromazin. Allerdings stellte AXELROD bei Hemmkonzentrationen von $1,0 \times 10^{-5}$ M bzw. $1,0 \times 10^{-4}$ M mit 32 % und 60 % Abnahme im Gegensatz zu unseren Versuchen eine wesentlich stärkere Beeinflussung der enzymatischen Reaktion fest. DOMINO hingegen fand bei einer Konzentration von $1,0 \times 10^{-4}$ M eine schwache Hemmung von 14,4 %.

Das Butyrophenon-Derivat Trifluperidol setzte die Aktivität der INMT bei einer Konzentration von 4,8 x 10^{-6} M um 17,1 % herab, bei einer Konzentration von 4,8 x 10^{-5} M registrierten wir ein Absinken der Aktivität um 21,4 % (siehe Tab. 5 und Abb. 24). Vergleicht man die eingesetzten Substanzmengen mit therapeutischen Dosen, so muß darauf hingewiesen werden, daß die Inhibitorkonzentration um Faktor 10 zu hoch gewählt wurde.

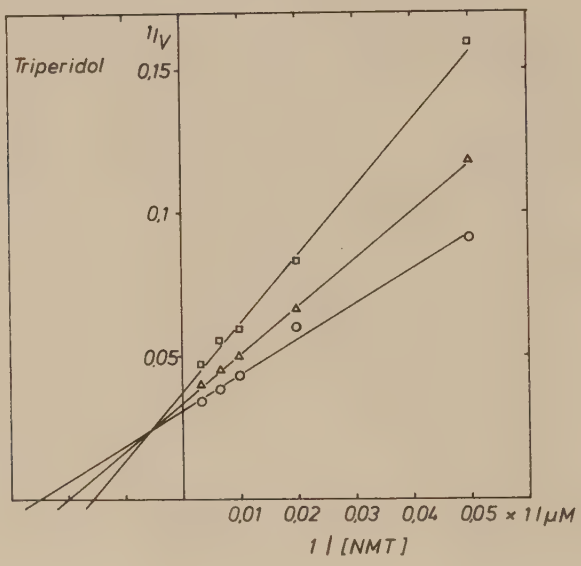


Abb. 24: Reziproke Darstellung der Substratkonzentrationskurve mit Trifluperidol als Inhibitor
o——o ohne Inhibitor
Δ——Δ 1 ug Trifluperidol
□——□ 10 ug Trifluperidol im Inkubat

Oxypertin und Perphenazin zeigten keinerlei Einfluß auf die enzymatische Umsetzung von N-Methyltryptamin.

Eine aktivitätsmindernde Wirkung auf den enzymatischen Vorgang konnten wir ebenfalls für Imipramin nachweisen. Die Lineweaver-Burk Auftragung der Daten (Abb. 25) ergibt eine nichtkompetitive Hemmung der Reaktion. Dieser Befund bestätigt die Untersuchungsergebnisse von AXELROD (3), der für die Inhibitorkonzentrationen 1,0 x 10^{-4} M und 5,0 x 10^{-5} M 50 % und 30 % Hemmung beobachtete.

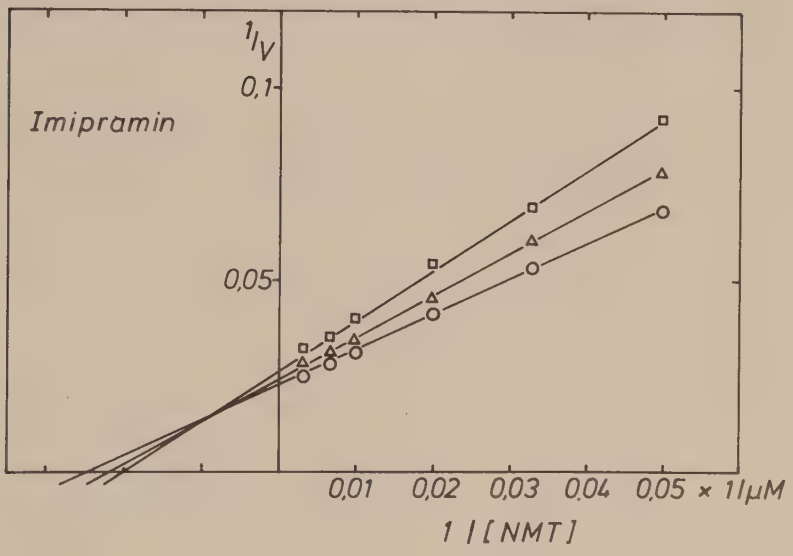


Abb. 25: Reziproke Darstellung der Substratkonzentrationskurve mit Imipramin als Inhibitor
o——o ohne Inhibitior
Δ——Δ 5 ug Imipramin
□——□ 50 ug Imipramin im Inkubat

Das zweite, aus der Gruppe der Antidepressiva ausgewählte Pharmakon Amitryptilin beeinflußte die Reaktion nicht.

Eine unspezifische Stimulierung bei niedriger und eine schwache Hemmung bei höherer Konzentration konnten wir für Amphetamin feststellen. Inkubationen ohne das Substrat NMT bestätigten, daß der cpm-Wert bei Szintillationsmessungen in Gegenwart geringer Amphetamin-Konzentrationen über dem Standard (denaturiertes Enzym) lag. Bei einer anschließenden Testreihe mit ansteigenden Substanzmengen fanden wir bei niedrigen Konzentrationen eine schwache Aktivitätszunahme (ca. 7 %), während Amphetamin die Enzymaktivität in höheren Dosen geringfügig hemmte (unter 10 %).

Die Substanz, die wohl am häufigsten auf ihre Hemmwirkung hin untersucht wurde, ist zweifellos das Endprodukt der enzymatischen Reaktion selbst: N,N-Dimethyltryptamin. Es hemmte die INMT nicht-kompetitiv (Abb. 26).

Zur besseren Übersicht wurden die Befunde einiger Arbeitsgruppen, die das Enzym ebenfalls aus Kaninchen-Lunge isolierten und DMT als Inhibitor einsetzten, tabellarisch zusammengetragen (Tab. 6).

Untersucher	NMT Konz. im Inkubat [M]	DMT Konz. im Inkubat [M]	K_i-Wert [M]	Hemmung [%]
DOMINO E. F. (21)	$1{,}0 \times 10^{-3}$	$1{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}8 \times 10^{-4}$	35,8
KRAUSE R. R. et al. (47)	$1{,}0 \times 10^{-3}$	$1{,}8 \times 10^{-4}$	$1{,}8 \times 10^{-4}$	50
MANDEL L. R. (64)	$1{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}0 \times 10^{-4}$	———	70
eigene Untersuchungen	$1{,}0 \times 10^{-5}$ $3{,}0 \times 10^{-4}$	$5{,}0 \times 10^{-5}$ $5{,}0 \times 10^{-4}$	$3{,}0 \times 10^{-5}$ $2{,}4 \times 10^{-4}$	61,3 67,1

Tab.6: Zusammenstellung einiger Literaturangaben mit N,N-Dimethyltryptamin als Inhibitor.

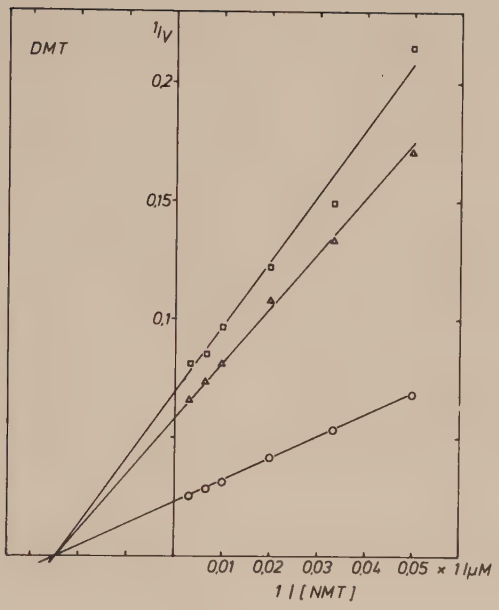


Abb. 26: Reziproke Darstellung der Substratkonzentrationskurve mit N,N-Dimethyltryptamin als Inhibitor
o——o ohne Inhibitor
Δ——Δ 5 ug N,N-Dimethyltryptamin
□——□ 50 ug N,N-Dimethyltryptamin im Inkubat

N,N-Dimethyltryptamin zeigte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MANDEL (64), KRAUSE und DOMINO (47) und DOMINO (21) von allen Inhibitoren den stärksten Einfluß auf das Enzym. Bei Einsatz einer Inhibitorkonzentration von $5{,}0 \times 10^{-5}$ M betrug die Hemmung 61,3 %, bei einer Konzentration von $5{,}0 \times 10^{-4}$ M wurde die Aktivität um 67,1 % gesenkt.

Die beiden Substanzen mit den stärksten Inhibitoreigenschaften, Chlorpromazin und N,N-Dimethyltryptamin, wurden in einem weiteren Versuch eingesetzt: Bei konstanter NMT-Konzentration wurde die SAM-Konzentration unter sonst gleichbleibenden Bedingungen variiert. Die Konzentration an Inhibitorsubstanz wurde aus den vorgehenden Versuchen übernommen.

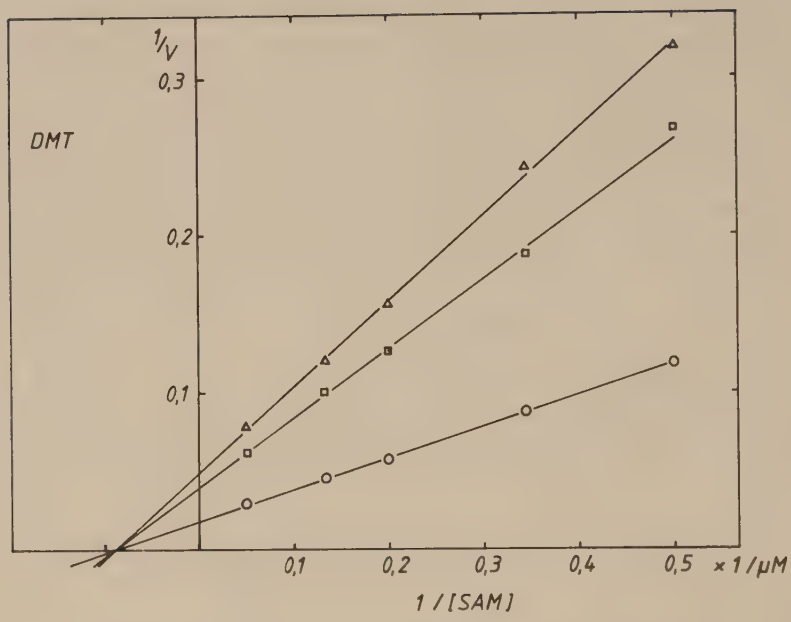


Abb. 27: Lineweaver-Burk-Diagramm bei variierter SAM-Konzentration und N,N-Dimethyltryptamin als Inhibitor
o——o ohne Inhibitor
Δ——Δ 5 ug N,N-Dimethyltryptamin
□——□ 50 ug N,N-Dimethyltryptamin im Inkubat

Wie Abb. 27 zeigt, ergibt sich bei diesen Inkubationsverhältnissen eine nicht-kompetitive Hemmung für DMT gegenüber dem Methyldonator SAM. Als Inhibitorkonstanten wurden $4{,}2 \times 10^{-5}$ M und $2{,}7 \times 10^{-4}$ M berechnet. KRAUSE und DOMINO (47) gelangten bei ihren Inkubationsversuchen in Gegenwart von DMT zu einem ähnlichen Resultat. Für eine Inhibitorkonzentration von $1{,}8 \times 10^{-5}$ M erreichten sie einen K_i-Wert von $1{,}0 \times 10^{-5}$ M bei nicht-kompetitiver Hemmung gegen SAM.

Die in Gegenwart von Chlorpormazin erzielten Resultate wurden ebenfalls in ein Lineweaver-Burk Diagramm übertragen (Abb. 28). Die Darstellung läßt erkennen, daß sich Chlorpromazin gegenüber SAM als unkompetitiver Inhibitor verhält. Da ähnliche Hemmver-

suche mit Chlorpromazin bisher noch nicht beschrieben wurden, kann ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren nicht angestellt werden.

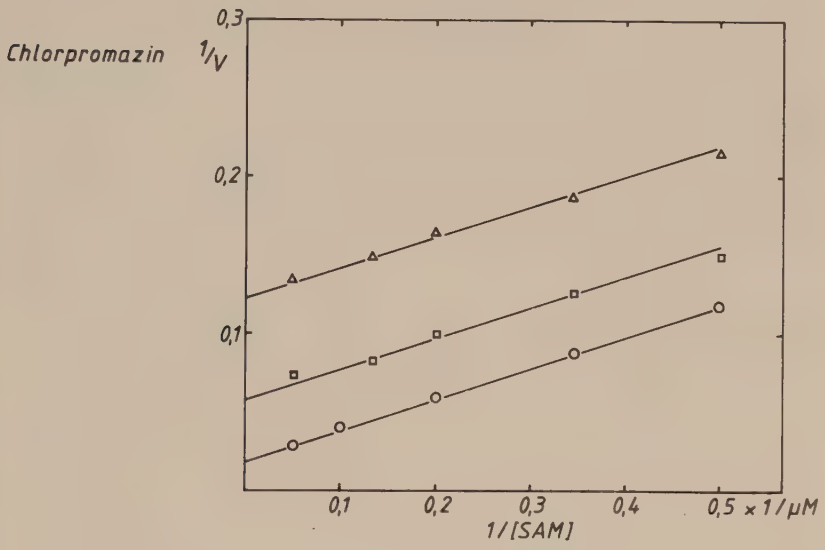


Abb. 28: Lineweaver-Burk-Diagramm bei variierter SAM-Konzentration und Chlorpromazin als Inhibitor
o——o ohne Inhibitor
Δ——Δ 5 ug Chlorpromazin
□——□ 50 ug Chlorpromazin im Inkubat

DISKUSSION:

Eine kritische Überprüfung der publizierten Verfahren zur Aufklärung der durch das Enzym Indol-N-Methyltransferase (INMT) katalysierten N-Methylierung von Indolen läßt erkennen, daß die Schwierigkeiten der Untersucher besonders in der Methode zur Identifizierung der Endprodukte zu suchen sind.
Der Ablauf der zugrunde liegenden, enzymatischen Reaktion und damit die Frage, ob eine endogene Bildung von N,N-Dimethyltryptamin (DMT) möglich ist, muß aufgrund unvollkommener Untersuchungsmethoden umstritten bleiben.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, die Existenz des Enzyms Indol-N-Methyltransferase, das die Reaktion N-Methyltryptamin (NMT) zu N,N-Dimethyltryptamin katalysieren kann, mit exakten analytischen Verfahren wie der Gaschromatographie (GC) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) nachzuweisen, und die einzelnen Reaktionsbedingungen für einen Enzym-Test zu erarbeiten. Mit verschiedenen Psychopharmaka und Psychodysleptika sollte anschließend die Wirkung psychotroper Substanzen auf die katalytische Aktivität der Indol-N-Methyltransferase geprüft werden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen mußten wir uns zunächst mit den methodischen Problemen der Extraktion von DMT aus der biologischen Probe und seiner genauen Identifizierung auseinandersetzen. Das von uns ermittelte, analytische Verfahren zur Abtrennung und Bestimmung des enzymatisch entstandenen Endprodukts soll vor der Besprechung des eigentlichen Enzym-Tests und einer Beantwortung der Frage, in welchem Maße Psychopharmaka darauf Einfluß nehmen können, in einigen Ausführungen dargelegt werden.

Zur Analyse der durch enzymatische Reaktionen gebildeten Indole wurden zahlreiche Bestimmungsmethoden wie z.B. DC-Auftrennung (9, 21, 63, 71, 74), Kokristallisation (84,85),

Fluoreszenz-Analyse (25, 26, 76) und radiochemischer Test (3, 41, 47, 64, 67, 75) entwickelt. Die Aussagekraft dieser Verfahren, die entweder einzeln oder in Kombination angewendet wurden, ist jedoch unterschiedlich zu bewerten. Nicht nur die exakte Differenzierung zwischen Substrat und Endprodukt bereitete den einzelnen Untersuchern Schwierigkeiten; auch aus dem Methyldonator S'Adenosylmethionin (SAM) freigesetzter Formaldehyd, der mit den Indoläthylaminen zu Tetrahydro-ß-Carbolinen cyclisieren kann, gibt Anlaß zu widersprüchlichen Ergebnissen; die Endprodukte dieser Kondensations-Reaktion lassen sich nämlich kaum von enzymatisch gebildetem DMT unterscheiden.
So gelang es HOLMSTEDT (39) nicht, N,N-Dimethyltryptamin, 5-Hydroxytryptamin und 5-Hydroxy-N,N-Dimethyltryptamin in einer gemeinsamen Lösung durch Fluoreszenz-Analyse einzeln zu bestimmen. Auch OLIVER et al. (78) wiesen auf die Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Tryptaminen neben anderen Indolen hin, die durch Interferenzerscheinungen bei UV- und Fluoreszenz-Messungen gekennzeichnet sind.

Bei dem von uns verwendeten radiochemischen Testverfahren mit Tritium-markiertem SAM als Methyldonator, wobei die Menge der extrahierbaren, radioaktiven Substanzen als Bewertungsgrundlage für den enzymatischen Umsatz diente, kann es z.B. durch Kontamination zu fehlerhaften Zählraten kommen, die durch verschlepptes SAM-^{3}H oder enzymatisch gebildeten, radioaktiv markierten Methanol bzw. Formaldehyd (4, 69, 85) verursacht werden. Diese Fehlermöglichkeit läßt sich durch die von uns entwickelte Extraktionsmethode, Ausschütteln der Probe mit dem Toluol-Isoamylalkohol-Gemisch und Eindampfen bis zur Trockene, ausschalten.

Wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten, extrahiert das Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 97 Teilen Toluol und 3 Teilen Isoamylalkohol, kein radioaktiv markiertes SAM; beim anschließenden Abdampfvorgang werden die möglicherweise

vorhandenen, radioaktiv markierten Wirkstoffe Methanol und Formaldehyd quantitativ aus der Probe entfernt. Dabei ergibt sich, insbesondere beim Abdampfen im Chromatographie-Ofen, nur ein geringer Verlust an radioaktiv markiertem DMT von 5,6%.

Die während der enzymatischen Umsetzung gebildeten Kondensationsprodukte von Indolen mit Formaldehyd vom Tetrahydro-ß-Carbolin-Typ sind in einer Vielzahl dünnschicht-chromatographischer Systeme isographisch mit NMT oder DMT (42,55,85).

Diese Artefakte konnte ROSENGARTEN (85) in dem basischen Fließmittelsystem: Isopropanol-1 N Ammoniumhydroxid-Wasser (80:10:10) von NMT und DMT abtrennen und identifizieren.

Ebenfalls konnte mit dem von uns entwickelten, basischen Fließmittelsystem (II): Chloroform-Methanol-wäßrige Ammoniumhydroxidlösung 25% (60:40:2) eine gute Trennung erreicht werden. Die Lage der DMT Flecke korrelierte in beiden Laufmitteln mit dem Maximalwert der über die gesamte Laufstrecke extrahierten,radiochemisch meßbaren Substanzen. Es ergab sich kein Hinweis auf mögliche Kunstprodukte. Wegen der besseren Trennleistung und der kürzeren Entwicklungszeit (1 1/2 Std. gegenüber 3 1/2 Std.) entschieden wir uns für die Anwendung des von uns entwickelten Fließmittels (II).

Mit dem sauren Laufmittelgemisch (I): n-Butanol-Essigsäure-Wasser (80:20:20), das z.B. NARASIMHACHARI et al. (74), BOARDER et al. (12) und BANERJEE et al. (7) verwendeten, ist die Auftrennung der beiden Substanzen NMT und DMT ungünstiger; die Rf-Werte liegen ziemlich nah beieinander. Dadurch läßt sich der Maximalwert an extrahierbarer Radioaktivität für die Substanzflecke von DMT im DC nur unvollkommen einordnen. Wie GC- und GC-MS-Untersuchungen ergaben, konnte so mithilfe der Dünnschicht-Chromatographie eine zufriedenstellende Abtrennung störender Begleitsubstanzen vor dem eigentlichen radiochemischen Test erreicht werden.

ROSENGARTEN und FRIEDHOFF (83) stellten 1976 alle angewandten Untersuchungsmethoden zusammen und werteten die Ergebnisse der Produkt-Identifikation in einer tabellarischen Übersicht aus. Für den enzymatischen Umsatz mit SAM als Methyldonator führten sie 20 Studien auf, von denen keine (!) über GC-MS-Untersuchungen verfügt. Dennoch existieren Arbeiten, die die zu bestimmenden Substanzen mit einem gekoppelten GC-MS-System analysieren. So beschreibt NARASIMHACHARI (74) eine Methode, die das N,N-Dimethyltryptamin über die Bestimmung des Ions mit der Masse 58 erfaßt; diese Massenzahl ist allerdings nur allgemein für tertiäre Amine charakteristisch, so daß dieses Verfahren kaum geeignet ist, das DMT in einer biologischen Probe zu entdecken und selektiv neben begleitenden Substanzen zu bestimmen.

Unsere ausführlichen Voruntersuchungen zur genauen Bestimmung von N,N-Dimethyltryptamin versetzen uns in die Lage, eine völlig neue Methode zur Abtrennung und Identifizierung der Substanz anzubieten, die eine sichere Beurteilung der enzymatischen Bildung von N,N-Dimethyltryptamin mittels GC- und GC-MS-Analyse gewährleistet und durch mögliche Artefakte unbeeinflußt bleibt. Sowohl bei der gaschromatographischen Auftrennung als auch bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse wird das sekundäre Amin N-Methyltryptamin mittels Derivatisierung vom N,N-Dimethyltryptamin getrennt. Beide Verbindungen lassen sich gaschromatographisch wiederum gut von der Standardsubstanz 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin abgrenzen, die als Bezugsgröße zur quantitativen Bestimmung dient. Die mit unserem Verfahren erzielten GC-MS Daten wurden im angeschlossenen Datensystem gespeichert und nach Aufzeichnung aller GC-Läufe mühelos ausgewertet. Anhand des Massenspektrums läßt sich DMT über den Molekülpeak M^+ 188 sicher identifizieren.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität und der K_m-Werte der Indol-N-Methyltransferase erfolgte ausschließlich aus den Daten unserer gaschromatographisch-massenspektrometri-

schen Messungen. Die GC-MS-Methode wurde darüber hinaus zur Kontrolle der Ergebnisse eingesetzt, die durch die übrigen analytischen Verfahren erzielt wurden.

Ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse aus den enzymatischen Untersuchungen, insbesondere auf quantitativer Basis, mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen ist schwierig, da zu unterschiedliche Reinheitsgrade der Indol-N-Methyltransferase und z.T. erheblich differierende Inkubationsbedingungen gewählt wurden. Einige Untersucher benutzten den Überstand des Homogenats ohne weiteren Reinigungsschritt als Enzymquelle (9,21,29,47,62,74,76,87,96). Eigene Beobachtungen und die Resultate anderer Arbeitsgruppen (63, 64, 66) lassen jedoch erkennen, daß der spezifischen Methylierungsreaktion durch die verhältnismäßig hohen Konzentrationen an Substraten sowie anderen methylierenden Enzymen in der "Biomasse" der Protein-Stammlösung nur eine bescheidene Aussagekraft zukommt. Das Ergebnis wird durch störende Nebenreaktionen verfälscht.

Die Angaben über die Inkubationszeiten schwanken in der Literatur zwischen 30 Min. (8) und 120 Min. (63), wobei die Mehrzahl der Untersucher Inkubationszeiten zwischen 60 und 90 Min. angeben. Linearität des Umsatzes ergibt sich nur innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls. Unter den von uns festgelegten Standardbedingungen findet sich eine lineare Abhängigkeit des Umsatzes von der Zeit bis zu einer Inkubationsdauer von ca. 120 Min..

Von allen Untersuchern wird eine Inkubationstemperatur von 37° C gewählt. Das unter Eiskühlung zusammengegebene Inkubationsgemisch unserer Ansätze hatte nach der Aufwärmzeit (5 Min.) die erforderliche Badtemperatur erreicht; die Zugabe der eiskalten Enzymlösung wirkte sich nicht meßbar auf die Anfangsgeschwindigkeit aus, so daß eine initiale Verzögerung der Reaktion nicht festgestellt werden konnte.

In den oben zitierten Untersuchungen anderer Autoren werden zur Bestimmung der Enzymaktivität der Indol-N-Methyltransferase bei unterschiedlichen pH-Werten vorwiegend Tris-HCl- und Phosphatpuffersysteme verwendet. Die Molarität des zugesetzten Puffers schwankt dabei zwischen 0,005 M und 0,5 M, die aktuelle Konzentration des Puffers im Inkubationsansatz ist vielen Arbeiten nicht zu entnehmen. Art und Molarität des verwendeten Puffers aber beeinflussen die maximale Umsatzrate und das pH-Optimum. Unseren Beobachtungen zufolge liegt die Umsatzrate bei Einsatz von 0,02 M Phosphatpuffer am höchsten. Das pH-Optimum unserer Reaktion fanden wir bei pH 7,8.

Die Vermutung einiger Forschungsgruppen (9,47,87), daß durch Dialyse der eingesetzten Proteinproben eine starke Aktivitätszunahme für die Indol-N-Methyltransferase erreicht werden kann, ließ sich durch unsere Untersuchungen voll bestätigen. In Parallelversuchen konnten wir beobachten, daß sowohl bei Verwendung undialysierten Homogenats als auch bei Einsatz undialysierter 55 %iger Ammoniumsulfat-Fällung die Zählraten der Proben im radiochemischen Testverfahren jeweils annähernd so hoch lagen wie die der Blindproben ohne Substrat. Bei Verwendung dialysierter Protein-Stammlösungen der gleichen Proben stellten wir für das Homogenat eine Zunahme der Zählrate um Faktor 3,2 fest; für die Proteinprobe, die durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (= 55 % Sättigung) erzielt wurde, ergab sich sogar ein Anstieg des cpm-Wertes um Faktor 42.

Schon einige andere Untersucher (9,47,87), insbesondere LIN et al. (57), konnten feststellen, daß die Enzymaktivität der Indol-N-Methyltransferase offensichtlich durch Inhibitoren kontrolliert wird, die sich durch Dialyse entfernen lassen. Die Existenz endogener Inhibitorsubstanzen wird immer häufiger in Zusammenhang mit der INMT-Aktivität bei Schizophrenen gebracht (57, 75, 87, 104).

Nach Abschluß unserer Untersuchungen über das Dialyseverhalten der Indol-N-Methyltransferase erschien die Arbeit von LIN und Mitarbeitern (56), in der die Untersucher von zwei Inhibitorsubstanzen der INMT berichteten; diese Hemmstoffe konnten durch Gelelektrophorese von der übrigen Proteinmasse einer aufgearbeiteten Probe aus Kaninchenlunge abgetrennt werden und waren imstande, die Umsatzraten des dialysierten Enzyms auf das Niveau undialysierter Proben zu senken.

Für die aus Kaninchenlunge isolierte Indol-N-Methyltransferase geben nur KRAUSE und DOMINO (47) Michaelis-Konstanten für beide Substrate, NMT und SAM, an. Die übrigen Autoren bestimmen nur den K_m-Wert für NMT; in der Wahl der SAM-Konzentration orientieren sie sich offensichtlich an empirisch gefundenen Daten. Der enzymatischen Übertragung der Methylgruppe liegt jedoch eine Enzym-Reaktion mit zwei Substraten zugrunde, so daß auch der K_m-Wert für den Methyldonator SAM bei der Aufstellung der Reaktionsbedingungen für einen Enzym-Test Berücksichtigung finden muß.

Unsere umfangreichen Untersuchungen zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten erlauben es, die K_m-Werte für das Substrat N-Methyltryptamin und den Methyldonator S'Adenosylmethionin zu berechnen. Da zur Ermittlung der erforderlichen Daten erstmals auch GC- und GC-MS-Messungen in die Versuche einbezogen wurden, dürfte sich unser Befund vor allem wegen der hohen Zuverlässigkeit deutlich von den bisher bekannten Werten unterscheiden. Für das Substrat NMT wurde die Michaelis-Konstante über die Auftragung der Meßergebnisse im Lineweaver-Burk-Diagramm erhalten. Eine genaue Bestimmung des K_m-Wertes für SAM erfolgte über das Verfahren von LAIDLER und BUNTING (51). Wir fanden für das Substrat NMT einen K_m-Wert von $4{,}0 \times 10^{-5}$ M und für SAM einen K_m-Wert von $1{,}2 \times 10^{-5}$ M.

Ein Vergleich unserer Werte mit dem Ergebnis von KRAUSE und

DOMINO (47), die für NMT einen K_m-Wert von 2,0 x 10^{-4} M und für SAM einen K_m-Wert von 0,9 x 10^{-5} M fanden, scheint uns aus folgenden Gründen problematisch zu sein:
1. Die erforderlichen Daten gewinnen KRAUSE und DOMINO nach Inkubation mit radioaktiv markiertem SAM über eine dünnschicht-chromatographische Auftrennung der Substanzen und eine anschließende Bestimmung der radioaktiven Produkte durch Szintillationsmessung.
2. Als Enzymquelle verwenden die Autoren den dialysierten Überstand des Homogenats.
Anhand unserer Versuchsergebnisse konnten wir jedoch feststellen, daß zur Ermittlung kinetischer Größen der INMT neben einer exakten Bestimmungsmethode die Qualität der verwendeten Enzymquelle von entscheidender Bedeutung ist. Bei einem Vergleich der K_m-Werte zwischen der 55 %igen Ammoniumsulfat-Fällung und der aktivsten Fraktion der Sephadex-Auftrennung zeigte sich für unsere Aufbereitungsmethode eine Abnahme um den Faktor 2,7. Enzymversuche mit Proteinproben aus dem Überstand des Homogenats, wie sie KRAUSE und DOMINO verwenden, sind folglich kaum zur Berechnung genauer K_m-Werte geeignet.

Als wesentliches Ergebnis unserer biochemisch-analytischen Untersuchungen zur Optimierung der enzymatischen Reaktionsbedingungen kann der folgende Befund erhoben werden:

Das mit unserer Methode aus Kaninchenlunge isolierte Enzym Indol-N-Methyltransferase ist unter den von uns erarbeiteten Reaktionsbedingungen in der Lage, den Alkylstickstoff (nicht den Indolstickstoff!) von N-Methyltryptamin mit S'Adenosylmethionin als Methyldonator zu methylieren, so daß als Endprodukt der enzymatischen Reaktion N,N-Dimethyltryptamin entsteht.

Unsere Versuche ohne das Substrat NMT im Inkubationsansatz ergaben keinerlei Hinweise auf Nebenreaktionen und eventuell

daraus resultierende Artefakte; in Gegenwart denaturierten Enzyms wurden im radiochemischen Test ebenfalls nur sehr niedrige Zählraten gefunden, die eine mögliche Bildung von DMT oder anderer meßbarer Produkte aufgrund nichtenzymatischer Reaktionen ausschlossen. Deshalb dienten uns diese beiden Ansätze zur Ermittlung der Blindproben-Werte. Die Höhe der radioaktiv meßbaren Verunreinigungen lag im Mittel bei 1,2 bis 6,8 % der Werte, die in Gegenwart des Substrats und mit unversehrtem Enzym erzielt wurden.

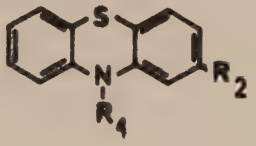
In unseren Versuchen zur Beeinflussung der INMT-Aktivität durch Psychopharmaka konnten wir nachweisen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Übertragung der Methylgruppe von SAM auf NMT in Gegenwart der Substanzen Chlorpromazin, N,N-Dimethyltryptamin, Imipramin und Trifluperidol gesenkt wird. Wie ein Blick auf Tab. 5 zeigt, ist diesen Wirkstoffen eine nicht-kompetitive Hemmung der enzymatischen Umsetzung von NMT gemein. Bei konstanter NMT- aber unterschiedlich hoher SAM-Konzentration verhielten sich DMT als nicht-kompetitiver Hemmstoff, Chlorpromazin als unkompetitiver Inhibitor gegenüber SAM.

In Gegenwart der Pharmaka Amitryptilin, Amphetamin, Oxypertin und Perphenazin änderte sich der enzymatische Umsatz nicht.

Da die von uns geprüften Substanzen in ihrer Wirkkonzentration in vivo zum Teil erheblich voneinander abweichen, wurden zu den Versuchen die therapeutisch effektiven Dosen zugrunde gelegt. Auf Untersuchungen in höheren Dosisbereichen wurde deshalb bewußt verzichtet.

Aus der Sicht biochemisch orientierter Pharmakologie haben sich einige Erkenntnisse für eine methodische Beurteilung der Wirkungsqualitäten der Psychopharmaka ergeben, die auch für unsere Resultate von Bedeutung sein könnten.
Eine Betrachtung des Phenothiazin-Grundkörpers weist diesen

als tricyclisches Ringsystem aus. Die einzelnen Vertreter unterscheiden sich durch Substitution am N-Atom oder in Position 2:



Die Alkylen-Seitenkette (R_1) mit mindestens 3 linear angeordneten Kohlenstoffatomen und einer einfach oder zweifach methylierten Aminogruppe als Endglied ist für die antipsychotische Wirksamkeit von großer Bedeutung. Der antipsychotische Effekt läßt sich durch Einführung eines Chloratoms (R_2) in Position 2 noch erhöhen.

Die beiden von uns getesteten Substanzen Chlorpromazin und Perphenazin erfüllen diese Voraussetzungen; nur eine Verlängerung der Propylseitenkette des Perphenazins um einen Piperazinyl-Rest unterscheidet es vom Chlorpromazin. Deshalb muß es erstaunen, daß die Hemmung der Enzymaktivität durch Chlorpromazin nicht auch bei Perphenazin gefunden wurde.

Die Kettenverlängerung durch den Piperazinyl-Rest und eine damit verbundene Änderung der stereochemischen Eigenschaften könnte für dieses andersartige Verhalten verantwortlich sein. Die Beweglichkeit der Seitenkette und die Stellung des Alkyl-Stickstoffs zum Ringsystem wurden durch Röntgenstrukturanalysen an Phenothiazinen näher untersucht. Man nimmt an, daß die unterschiedliche Einstellung der Kette zu den elektronegativen Substituenten in 2-Stellung z.B. entscheidend für die neuroleptische Wirkung dieser Verbindungen ist (ZIGEUNER, 105). Durch Modifikation der Alkylenseitenkette nimmt das Perphenazin-Molekül eine andere räumliche Konfor-

mation ein als das Chlorpromazin-Molekül. Möglicherweise bietet es dadurch für das Herantreten an den sich bildenden Enzym-Substrat-Komplex nicht die gleichen sterischen Voraussetzungen wie Chlorpromazin, so daß eine Einwirkung auf die Proteinstruktur des Enzyms, die zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität führen könnte, garnicht erst erfolgen kann.

Besonders bemerkenswert ist unser Befund über den Einfluß auf die INMT-Aktivität durch Chlorpromazin bei variierter SAM- und einer konstanten NMT-Konzentration im Inkubat:

Die Übertragung der Resultate in ein Lineweaver-Burk Diagramm zeigt eine unkompetitive Hemmung gegenüber dem Methyldonator SAM. Dieses Ergebnis gibt einen wertvollen Hinweis auf den Angriffspunkt des Inhibitors. Danach könnte die Bindung von Chlorpromazin an das Enzym zu einer Veränderung der Bindungsstelle für das Substrat NMT führen, so daß Chlorpromazin in therapeutisch angeglichenen Dosen befähigt ist, die Bindung von NMT an das Enzym zu erschweren; erst durch höhere NMT-Konzentrationen wird diese Beeinflussung zurückgedrängt.

Über die erzielten Ergebnisse wurde versucht, den Reaktionsmechanismus der Indol-N-Methyltransferase näher aufzuklären. Das Enzym katalysiert eine Zwei-Substrat-Reaktion von der Art (DIXON und WEBB, 19):

$$A + B \rightleftharpoons P + Q$$

Dabei lassen sich möglicherweise im einzelnen folgende Reaktionen unterscheiden:

$$A + E \rightleftharpoons EA$$

$$EA + B \rightleftharpoons (EAB) \rightleftharpoons (EPQ) \rightleftharpoons EQ + P$$

$$EQ \rightleftharpoons E + Q$$

Darin ist:

A = S'Adenosylmethionin
B = N-Methyltryptamin
P = N,N-Dimethyltryptamin
Q = S'Adenosylhomocystein
E = Enzym

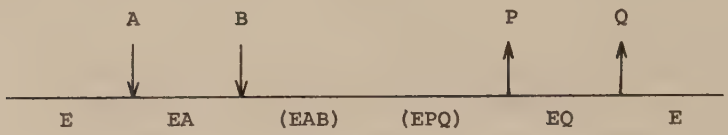
Wird bei konstanter Konzentration A die Substratmenge B variiert, so sollte eine Reaktion des Michalis-Menten-Typus zu beobachten sein, bei der die durch Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm entstehende Gerade die Abszisse im Punkt - $1/K_m$ schneidet. Das gleiche sollte bei vorgegebenem B und veränderlichem A der Fall sein.

Wie aus den Abbildungen 19, 20 und 21 hervorgeht, trifft der von DIXON und WEBB beschriebene Mechanismus auf die von der INMT katalysierte Übertragung der Methylgruppe zu; zur Katalyse der Reaktion bildet sich folglich ein ternärer Komplex aus (Enzym + zwei Substrate).

Dieser Reaktionstyp wird über die Theorien von DIXON und WEBB hinausgehend ausführlich von CLELAND (16, 17) beschrieben. Er unterscheidet für Zwei-Substrat-Reaktionen vier Hauptgruppen von Reaktionsmechanismen, die über Substratsättigungs- und Produkthemmungskurven bestimmt werden. Es sind im einzelnen der "Sequenz", der "geordnete", der "ungeordnete" und der "Ping Pong" Mechanismus mit entsprechenden Untergruppen.

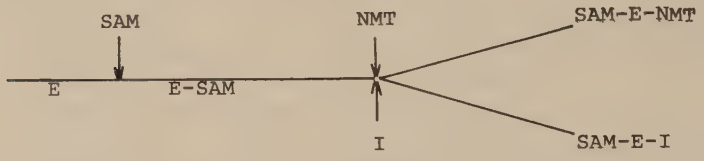
Mithilfe der durchgeführten Studien über die Produkthemmung der Reaktion und die Bindungsvorgänge beim Entstehen des Enzym-Substrat-Komplexes konnte die Reaktion näher bestimmt werden. In Versuchen mit dem Inhibitor Chlorpromazin wurde ein unkompetitiver Hemmtyp im Hinblick auf SAM beobachtet. Dieser Befund läßt für den Reaktionsmechanismus der INMT die folgende Deutung zu:

In einer geordneten Addition tritt zunächst das SAM als "führendes" Substrat an das Enzym heran und bildet den Enzym-SAM-Komplex; in einem zweiten Schritt verbindet sich dieser Komplex mit dem N-Methyltryptamin (Schema 1):



Schema 1: Möglicher Reaktionsmechanismus der INMT

Genau diese zweite Reaktion, die Ausbildung des SAM-Enzym-NMT-Komplexes wird durch Chlorpromazin gehemmt, denn eine Erhöhung der SAM-Konzentration zeigt keinen Einfluß auf die Chlorpromazin-Hemmung (Schema 2). Sie wird jedoch durch höhere NMT-Konzentrationen zurückgedrängt. Der nicht-kompetitive Charakter der Hemmung gegenüber NMT läßt auf eine allosterisch bedingte Konformationsänderung des Enzymproteins durch den Inhibitor schließen.

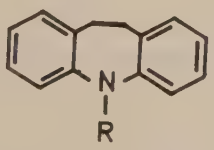


Schema 2: Vorschlag zur Beeinflussung der INMT durch einen Inhibitor (I) vom Typ des Chlorpromazins

Dieses Ergebnis findet Ergänzung durch die Arbeiten einiger Untersuchungsgruppen über den Verlauf der enzymatischen Reaktion in Gegenwart des Demethylierungsprodukts von SAM: S'Adenosylhomocystein (SAH) (13, 47, 55). Übereinstimmend berichteten sie von einem kompetitiven Charakter der Hemmung durch SAH gegenüber SAM und einem nicht-kompetitiven gegenüber NMT.

Bei einem Vergleich der "Product Inhibition Pattern for Bi Bi Mechanism" von CLELAND konnte maximale Übereinstimmung mit dem "Ordered Bi Bi" Mechanismus festgestellt werden: Die Substrate treten in vorgeschriebener Anordnung an das Enzym heran, und die Produkte dissoziieren in festgelegter Reihenfolge wieder ab. Dieser Befund bestätigt die Vermutungen von LIN et al. (55) und PORTA et al. (82), daß es sich bei der durch die INMT katalysierten Methylierung von Tryptamin um eine Methylgruppenübertragung vom oben beschriebenen Typ handelt.

Für die tricyclischen Antidepressiva lassen sich hinsichtlich der Wirkung auf die INMT-Aktivität ähnliche Überlegungen anstellen wir für die Gruppe der Phenothiazine. Stellung, Länge und Verzweigung der Seitenkette sind ebenfalls ausschlaggebend für die Unterscheidbarkeit der einzelnen Substanzen. Von den beiden von uns geprüften Antidepressiva führte nur Imipramin zu einer nicht-kompetitiven Hemmung gegenüber dem Substrat NMT, während Amitryptilin die Enzymaktivität nicht beeinflußte. Ein Vergleich zeigt für beide Arzneistoffe ein Dreier-Ringsystem, das nur an einer Stelle substituiert ist: Imipramin am Ringstickstoff durch eine Propylamin-Seitenkette, Amitryptilin in gleicher Position über einen doppelt gebundenen Kohlenstoff durch den gleichen Substituenten.



Die sterische Konformation der Verbindungen zeigt für Imipramin ein ebeneres Ringsystem als für Amitryptilin (38, 81, 99). Das Iminodibenzylderivat Imipramin ist in seiner Beweg-

lichkeit durch die über eine Doppelbindung substituierte Seitenkette stark eingeschränkt; bei Amitryptilin sind die Ringe stärker gegeneinander verdreht und verwinkelt. Die Frage, warum das wesentlich beweglichere Amitryptilin-Molekül, das sich nur durch den Ersatz des Stickstoffatoms im mittleren Ring gegen ein Kohlenstoffatom vom Imipramin unterscheidet, nicht zu einer Enzymhemmung führte, kann anhand unserer Versuchsergebnisse über stereochemische Zusammenhänge nicht erklärt werden.

In gleicher Weise muß auf eine Deutung der Hemmwirkung des Butyrophenonderivats Trifluperidol aufgrund ähnlicher Wesensmerkmale verzichtet werden. Die völlig andersartig gebaute Verbindung, die die Enzymaktivität, verglichen mit therapeutischen Dosen, erst bei 10facher Überdosierung um ca. 20 % senkte, zeichnet sich auch in der Klinik durch signifikante Unterschiede zu den Phenothiazinen aus.

Das Endprodukt der enzymatischen Reaktion N,N-Dimethyltryptamin beeinflußte die Enzymaktivität der Indol-N-Methyltransferase dergestalt, daß eine nicht-kompetitive Hemmung gegenüber dem Substrat N-Methyltryptamin und dem Methyldonator S'Adenosylmethionin resultierte. N,N-Dimethyltryptamin ließ die K_m-Werte unverändert und setzte nur die Reaktionsgeschwindigkeiten herab. Die Bindung des Hemmstoffs vollzieht sich demzufolge nicht am Bindungsort des N-Methyltryptamins.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Befunde anderer Forschungsgruppen, die die inhibitorischen Eigenschaften von DMT in der gleichen Weise prüften (21, 47, 64). DOMINO (21) spricht in diesem Zusammenhang von einem "Product Feedback Inhibitor". Damit soll das Zurückwirken des enzymatischen Endprodukts auf die ablaufende Reaktion charakterisiert werden.

Angesichts dieser Überlegungen muß konstatiert werden, daß sich für die inhibierende Wirkung der Substanzen, Chlorpromazin, N,N-Dimethyltryptamin, Imipramin und Trifluperidol

auf die Aktivität der INMT kein einheitlicher Wirkungsmechanismus aufzeigen läßt, so daß eine Korrelation zwischen der chemischen Struktur und einer kalkulierbaren Beeinflussung der Enzymaktivität aufgrund unserer Versuche nicht in Betracht gezogen werden kann. Der allen Substanzen gemeinsame nicht-kompetitive Charakter der Hemmung deutet daraufhin, daß die verschiedenen Stoffklassen angehörenden Psychopharmaka, die wir in unseren Untersuchungen einsetzten, zwar an das Enzym Indol-N-Methyltransferase gebunden werden, jedoch an Stellen, die nicht identisch mit dem aktiven Zentrum des Enzyms sind. Durch diese Bindung kann es aber zu einer unterschiedlich starken Beeinflussung der räumlichen Proteinstruktur kommen, die auch in einer unterschiedlich stark erniedrigten Bindungsfähigkeit für das Substrat resultiert.

Für das Chlorpromazin läßt sich vermuten, daß der beobachtete Effekt auf die Enzymaktivität in der spezifischen Struktur des Moleküls begründet ist.
Das tricyclische Ringsystem der Phenothiazine verfügt über eine große Anzahl frei beweglicher Elektronen, die für viele biochemische Reaktionen dieser Arzneimittel verantwortlich sein können. Aufgrund dieser Elektronendichte im Ringsystem könnte es folglich zu den beobachteten Interaktionen mit dem Enzymprotein kommen.

Innerhalb der kontroversen Entwicklung, die der N-Methylierungshypothese der Indole widerfahren ist, kann die vorliegende Arbeit als ein wichtiger Beitrag zur Absicherung der möglichen Entstehung abnormer Methylierungsprodukte gewertet werden. Bei der Übertragung unserer in-vitro Studien in den klinischen Bereich ist natürlich vorsichtige Zurückhaltung geboten. Dennoch könnte die von uns beschriebene enzymatische Reaktion, die die Möglichkeit einer endogenen Bildung von N,N-Dimethyltryptamin in Aussicht stellt, an der Pathogenese der Psychosen beteiligt sein. Eine Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch bereits seit Jahren in die Therapie eingeführte Psychopharmaka konnte in einigen Fällen

durch unsere Versuche demonstriert werden. Ob der Effekt dieser Pharmaka auf die Aktivität der Indol-N-Methyltransferase in irgendeiner Form mit dem klinischen Wirkungsmechanismus korreliert, muß durch weitere Studien abgeklärt werden.

Da Psychopharmaka in vielfältiger Weise Organ- und Zellfunktionen beeinflussen können, dürfte es schwierig sein, die für ihre therapeutische Effektivität verantwortliche Wirkung herauszufinden. Erschwerend tritt hinzu, daß mit vielen psychotrop wirksamen Arzneimitteln keine kausale Therapie betrieben werden kann, sondern daß ihr Einsatz nur durch eine indirekte Beeinflussung psychopathologischer Erkrankungen charakterisiert ist.

ZUSAMMENFASSUNG:

Das Vorkommen abnormer Metaboliten körpereigener Catechol- und Indolalkylamine bei schizophrenen Patienten wird häufig als mögliche Ursache dieser Erkrankung diskutiert, wobei vor allem die Rolle der an der Metabolisierung zerebraler Neurohormone beteiligten Enzymsysteme noch weitgehend ungeklärt ist. So wird bei der N-Methylierungshypothese der Indole postuliert, daß die Entstehung abnormer Methylierungsprodukte wie Bufotenin und N,N-Dimethyltryptamin (DMT) auf Störungen der enzymatischen Methylierung der Indole beruht.

Die halluzinogene Wirkung von Bufotenin und N,N-Dimethyltryptamin ist insbesondere am Beispiel des N,N-Dimethyltryptamins näher beschrieben worden. Dieses Psychotomimetikum wurde als Inhaltsstoff in verschiedenen berauschenden Drogen gefunden und konnte auch aus dem Blut und Urin normaler Personen und schizophrener Patienten isoliert werden. Die Annahme einer endogenen Bildung von N,N-Dimethyltryptamin wurde zwar durch die Auffindung eines N-methylierenden Enzyms für Indole unterstützt; unter Hinweis auf unvollkommene Untersuchungs- und Identifizierungsmethoden wurde dieser These jedoch häufig widersprochen.

Unsere in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf die Entwicklung und den routinemäßigen Einsatz eines biochemisch-analytischen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der Aktivität der Indol-N-Methyltransferase. Hierzu konnte eine völlig neue Versuchsanordnung entworfen werden, die es gestattet, das enzymatisch entstandene Endprodukt (DMT) durch Einsatz eines Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Systems neben anderen biologischen Substanzen sicher zu identifizieren. Unser Verfahren unterscheidet sich von den bisher publizierten durch die Methode zur Entfernung kontaminierender Begleitstoffe sowie durch die Art und Weise der qualitativen und quantita-

tiven Erfassung von N,N-Dimethyltryptamin. Es ist sehr gut geeignet, die katalytische Aktivität der Indol-N-Methyltransferase zu bestimmen.

Das Enzym Indol-N-Methyltransferase konnte unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen durch folgende Schritte angereichert werden:

1.) Homogenisation der biologischen Probe (Kaninchenlunge),
2.) Ammoniumsulfat-Fällung des Gewebe-Homogenats,
3.) Fraktionierung an Sephadex G-100.

Nach der gelchromatographischen Auftrennung zeigte die Fraktion mit der größten Aktivität eine 18fache Zunahme gegenüber dem Homogenat.

Eingehende Untersuchungen über den Einfluß von pH-Wert, Substrat- und Proteinkonzentration, des Inkubationsmediums sowie der Inkubationszeit führten zu einer Optimierung der enzymatischen Reaktionsbedingungen. Die Enzym-katalysierte Übertragung der Methylgruppe von S'Adenosylmethionin (SAM) auf N-Methyltryptamin (NMT) zur Bildung von N,N-Dimethyltryptamin konnte im in-vitro-Versuch demonstriert werden.

Durch den Einsatz eines Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Systems konnten wir erstmals eine zuverlässige Bestimmung der Michaelis-Konstanten für beide Substrate, N-Methyltryptamin und S'Adenosylmethionin, durchführen und folgende Werte erzielen:

K_m-Wert für NMT: $4{,}0 \times 10^{-5}$ M

K_m-Wert für SAM: $1{,}2 \times 10^{-5}$ M.

Für die zugrunde liegende Enzym-Reaktion mit zwei Substraten wurde anhand unserer Versuchsergebnisse der mögliche Reaktionsmechanismus erörtert. Maximale Übereinstimmung der be-

obachteten Eigenschaften ließ sich für den von CLELAND mit "Ordered Bi Bi" bezeichneten Mechanismus erzielen.

Nach Erarbeitung optimaler enzymatischer Reaktionsbedingungen erfolgte die Prüfung der inhibitorischen Eigenschaften verschiedener Psychopharmaka auf die enzymatische Bildung von DMT.

Aus der Gruppe der Neuroleptika wurden die Arzneistoffe Chlorpromazin, Oxypertin, Perphenazin und Trifluperidol ausgewählt. Von den Antidepressiva wurden das Amitryptilin und das Imipramin in die Untersuchungen einbezogen. Außerdem prüften wir das Psychotomimetikum Amphetamin und das Psychdysleptikum N,N-Dimethyltryptamin. Die in unseren in-vitro Studien eingesetzten Wirkstoff-Mengen orientierten sich an therapeutisch effektiven Dosen.

Unsere biochemisch-pharmakologischen Untersuchungen haben ergeben, daß Amitryptilin, Amphetamin, Oxypertin und Perphenazin keinen Einfluß auf die Indol-N-Methyltransferase-Aktivität ausübten.

Demgegenüber konnten wir mit Chlorpromazin, N,N-Dimethyltryptamin, Imipramin und Trifluperidol eine deutliche Hemmung der enzymatischen Bildung von DMT finden, wobei sich diese Hemmung im Lineweaver-Burk Diagramm bei variierter NMT-Konzentration als nicht-kompetitiv erwies. Mit Chlorpromazin ergab sich bei variierter SAM-Konzentration interessanterweise eine unkompetitive Hemmung gegenüber dem Methyldonator SAM.

Die Unterschiedlichkeit der Beeinflussung der Indol-N-Methyltransferase durch die geprüften Pharmaka könnte durch stereochemische Mechanismen bedingt sein. Obwohl eine direkte Übertragung unserer in-vitro Befunde auf die Verhältnisse beim Menschen nicht möglich ist, lassen die Ergebnisse vermuten,

daß eine Hemmung der Indol-N-Methyltransferase für die pharmakologische Wirkung der geprüften Psychopharmaka von nur geringer oder keiner Bedeutung ist.

Literaturverzeichnis

1. AHN,H.S.; WALKER,R.W.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.; ROSEGAY,A.; MANDEL,L.R.:
Studies on the in vivo biosynthesis of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in the rabbit and rat
Fed. Proc. 32, 511 (1973)

2. ARNOLD,O.H.; HOFMANN,G.:
Zur Psychopathologie des Dimethyltryptamin
Wiener Zeitschrift f.Nervenheilkunde 13, 438 (1957)

3. AXELROD,J.:
The enzymatic N-methylation of serotonin and other amines
J. Pharmacol. Exp. Ther. 138, 8836 (1962)

4. AXELROD,J.; COHN,C.K.:
Methyltransferase enzymes in red blood cells
J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 650 (1971)

5. BALDESSARINI,R.J.; KOPIN,I.J.:
S-Adenosylmethionine in brain and other tissues
J. Neurochem. 13, 769 (1966)

6. BANERJEE,S.P.; SNYDER,S.H.:
Methyltetrahydrofolic acid mediates N- and O-methylation of biogenic amines.
Science 182, 74 (1973)

7. BANERJEE,S.P.; SNYDER,S.H.:
N-Methyltetrahydrofolic acid: the physiological methyl donor in indoleamine N- and O-methylation
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 11, 85 (1974)

8. BANERJEE, S.P.; SNYDER, S.H.:
In Advances in Biochemical Psychopharmacology (Eds. E. Costa, G.L. Gessa and M. Sandler), Vol. 11, p. 85, Raven Press, New York (1974)

9. BHIKARIDAS,B.; MANN,L.R.B.; McLEOD,W.R.:
Indoleamine N-methyltransferase activity in human tissues
J. Neurochem. 24, 203 (1975)

10. BICKEL,P.; DITTRICH,A.; SCHOPF,J.:
Eine experimentelle Untersuchung zur bewußtseinsverändernden Wirkung von N,N-Dimethyltryptamin (DMT)
Pharmakopsych. 9, 220 (1976)

11. BIDDER,T.G.; MANDEL,L.R.; AHN,H.S.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.; WALKER,R.W.:
Blood and urinary dimethyltryptamine in acute psychotic disorders
Lancet 1, 165 (1974)

12. BOARDER,M.R.; RODNIGHT,R.:
Tryptamine-N-methyltransferase activity in brain tissue: a re-examination
Brain Res. 114, 359 (1976)

13. BORCHARDT,R.T.: Inhibition of indolethylamine-N-methyltransferase by analogs of S-adenosylhomocysteine
Biochem. Pharmacol. 24, 1542 (1975)

14. BRADLEY,P.B.; BRIGGS,I.:
Actions of serotonin and related substances on single neurons in the brain, in: Advances in Biochemical Psychopharmacology, Serotonin: New Vistas, Vol. 10, eds.E.Costa, G.L.Gessa and M.Sandler, Raven Press, New York, p. 159 (1974)

15. CARPENTER,W.T., Jr.; FINK,E.B.; NARASIMHACHARI,N.; HIMWICH,H.E.:
A test of the transmethylation hypothesis in acute schizophrenic patients
Am. J. Psychiatry 132, 1067 (1975)

16. CLELAND,W.W.: The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products
Biochim. Biophys. Acta 67, 104 (1963)

17. CLELAND,W.W.: Steady state kinetics
in The Enzymes: Kinetics and Mechanism, Vol. II, third edition by P.D.Boyer, p.1, Academic Press, New York and London (1970)

18. DELAY,J.: Intervention à propos de la terminologie et de la classification des médicaments psychiatriques; in: Psychopharmacology Frontiers, p. 426, Boston: Little-Brown (1959)

19. DIXON,M.; WEBB,E.C.:
Enzymes, 2nd edition, Longmans, London (1964)

20. DOMINO,E.F.: Indole alkyl amines as psychotogen precursors - possible neurotransmitter imbalance
in Neurotransmitter Balances Regulating Behaviour, ed. and publ. by E.F.Domino and J.M. Davis, Ann Arbor, 185 (1975)

21. DOMINO,E.F.: Search for new treatment approaches in schizophrenia: in-vitro studies of potential N-methyltransferase inhibitors
Arch. Int. Pharmacodyn. 221, 75 (1976)

22. DOMINO,E.F.; GAHAGAN,S.; ADINOFF,B.; KOVACIC,B.:
Effects of various neuroleptics on rabbit hyperthermia induced by N,N-dimethyltryptamine (DMT) and d-amphetamin
Arch. Int. Pharmacodyn. 226, 30 (1977)

23. DOMINO,E.F.; KRAUSE,R.R.; BOWERS,J.:
Various enzymes involved with putative neurotransmitters--regional distribution in the brain of deceased mentally normal, chronic schizophrenics or organic brain syndrome patients
Arch. Gen. Psychiat. 29, 195 (1973)

24. FILE,S.E.: Effects of N,N-dimethyltryptamine on behavioural habituation in the rat
Pharmacol. Biochem. Beh. 6, 163 (1977)

25. FISH,M.S.; HORNING,E.C.:
Studies on hallucinogenic snuffs
J. Nerv. Ment. Dis. 124, 33 (1956)

26. FISH,M.S.; JOHNSON,N.M.; HORNING,E.C.:
Piptadenia alkaloids. Indole bases of P.peregrina (L.) Benth. and related species
J. Am. Chem. Soc. 77, 5892 (1955)

27. FRANZEN,F.; GROSS,H.:
Tryptamine, N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine
Nature (Lond.) 206, 1052 (1965)

28. GAITONDE,M.F.: Sulfur amino acids. Chapt. 8 in Handbook of Neurochemistry, Vol. III, ed. by A. Lajtha, p. 225, Plenum Press, New York (1970)

29. GOMES,U.R.; NEETHLING,A.C.; SHANLEY,B.C.:
Enzymatic N-methylation of indoleamines by mammalian brain: fact or artefact?
J. Neurochem. 27, 701 (1976)

30. GREEN,A.R.; KOSLOW,S.H.; COSTA,E.:
Brain Res. 51, 371 (1973)

31. GREENBERG,D.M.: In Advances in Enzymology 25, 395 (1963)

32. GREENBERG,R.: N,N-Dimethylated and N,N-diethylated indoleamines in schizophrenia. In Chemical Modulation of Brain Function -- A Tribute to J.E.P.Toman, ed. by H.C.Sabelli, p.277, Raven Press, New York (1973)

33. HAUBRICH,D.R.; WANG,P.F.L.:
N,N-dimethyltryptamine lowers rat brain acetylcholine and dopamine
Brain Res. 131, 158 (1977)

34. HEINRICH, K.: Psychopharmaka in Klinik und Praxis
G.Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

35. HELLER,B.: N-Methylating enzyme in blood of schizophrenics
Psychosomatics 12, 273 (1971)

36. HIEMKE,Ch.: Untersuchungen zur Isolierung und gaschromatographischen Bestimmung von Katecholaminen, Serotonin und deren Metaboliten aus Urin, Serum und Liquor
Inaugural-Dissertation Bonn (1977)

37. HIMWICH,H.E.; NARASIMHACHARI,N.; HELLER,B.; SPAIDE,J.; HASKOVEC,L.; FUJIMORI,M.; TABUSHI,K.:
Biochemical approaches to the study of schizophrenia
In Chemical Modulation of Brain Function -- A Tribute to J.E.P. Toman, ed. by H.C. Sabelli, p. 297, Raven Press, New York (1973)

38. HIPPIUS,H.: Der Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und Wirkung der Psychopharmaka in: Probleme der Pharmakopsychiatrie,III. Starnberger Gespräche 1962, 1 Ed.: T. Scholibo, Stuttgart: Thieme (1966)

39. HOLMSTEDT,B.: Gas chromatographic analysis of some psychoactive indole bases
in Amines and Schizophrenia, Symp.Publ.Dir., Pergamon Press, 151 (1967)

40. HOLMSTEDT,B.; LINDGREN,J.:
In Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs (Efron D.H., ed.): 339 US Public Health Service, Washington D.C. (1967)

41. HSU,J.L.; MANDELL,A.J.:
Multiple N-methyltransferases for aromatic alkylamines in brain
Life Sci. 13, 847 (1973)

42. HSU,L.L.; MANDELL,A.J.:
Enzymatic formation of tetrahydro-ß-carboline from tryptamine and 5-methyl-tetrahydrofolic acid in rat brain fractions: regional and subcellular distribution
J. Neurochem. 24, 631 (1975)

43. HUSZKA, L.; ZABEK,D.H.; LOVETT DOUST,J.W.:
Urinary excretion of N,N-dimethylated tryptamines in chronic schizophrenia
Can. Psychiatr. Assoc. J. 21, 541 (1976)

44. McISAAC,W.: Formation of 1-methyl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2-carbolines under physiological conditions
Biochem. Biophys. Acta 52, 607 (1961)

45. KAISER,R.: Chromatographie in der Gasphase
Bibl. Inst., Mannheim (1961)

46. KAUERT,G.: Isolierung und gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung biogener Amine des Katechol- und Indolalkylamin-stoffwechsels aus Urin
Inaugural-Dissertation Bonn (1977)

47. KRAUSE,R.R.; DOMINO,E.F.:
Kinetics of product inhibition of rabbit lung N-methyltransferase
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 9, 359 (1974)

48. LADURON, P.: N-methylation of dopamine to epinine in brain tissue using N-methyltetrahydrofolic acid as the methyl donor
Nature New Biol. 238, 212 (1972)

49. LADURON,P.; GOMMEREN,W.; LEYSEN,J.:
N-methylation of biogenic amines.
I.Characterization and properties of an N-methyltransferase in rat brain using 5-methyltetrahydrofolic acid as the methyl donor
Biochem. Pharmacol. 23, 1599 (1974)

50. LADURON,P.M.; VERWIMP,M.F.; JANSSEN,P.F.M.; GOMMEREN,W.R.:
Tissue fractionation in rat brain, kidney and liver
I. Intracellular localization of a 5-methyl-tetrahydrofolic acid requiring enzyme
Biochimie 57, 253 (1975)

51. LAIDLER,K.J.; BUNTING,P.S.:

In the Chemical Kinetics of Enzyme Action, 2. Auflage, Clarendon Press, Oxford (1973)

52. LAUWERS,W.; LEYSEN,J.; VERHOEVEN,H.; LADURON,P.:

Identification of alkaloids: the condensation products of biogenic amines with formaldehyde, enzymatically formed from 5-methyltetrahydrofolic acid
Biomed. Mass Spectrom. 2, 15 (1975)

53. LEYSEN,J.; LADURON,P.:

N-methylation of indolealkylamines in the brain with a new methyl donor. In: Advances in Biochemical Psychopharmacology (Costa, Gessa and Sandler, eds.), Vol. 11, p. 65, New York, Raven Press (1974)

54. LIN,R.L.; NARASIMHACHARI,N.:

N-methylation of 1-methyltryptamines by indole-ethylamine-N-methyltransferase
Biochem. Pharmacol. 24, 1239 (1974)

55. LIN,L.R.; NARASIMHACHARI,N.; HIMWICH,H.E.:

Inhibition of Indolethylamine-N-Methyltransferase by S-Adenosylhomocysteine
Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 751 (1973)

56. LIN,R.L.; NARASIMHACHARI,N.; HIMWICH,H.E.:

Endogenous inhibitors for indolethylamine N-methyltransferase
Communic. Psychopharmacol. 1, 565 (1977)

57. LIN,R.L.; SARGEANT,S.; NARASIMHACHARI,N.:

Indolethylamine-N-methyltransferase in developing rabbit lung
Developmental Psychobiology 7, 475 (1974)

58. LINEWEAVER,H.; BURK,D.:

J. Chem. Soc. 56, 658 (1934)

59. LIPINSKI,J.F.; MANDEL,L.R.; AHN,H.S.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.; WALKER,R.W.:

Blood dimethyltryptamine concentrations in psychotic disorders
Biol. Psychiatry 9, 89 (1974)

60. LOWRY,O.H.; ROSEBROUGH,N.J.; FARR,A.; RANDALL,R.J.:

Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

61. MANDEL,L.R.: Dimethyltryptamine: its biosynthesis and possible role in mental disease in Neurotransmitter Balances Regulating Behavior, p. 175, edited and published by E.F.Domino and J.M.Davis, Ann Arbor (1975)

62. MANDEL,L.R.: Inhibition of indoleamine-N-methyltransferase by 2,3,4,6,7,8-hexahydropyrrolo (1,2-a)pyrimidine
Biochem. Pharmacol. 25, 2251 (1976)

63. MANDEL,L.R.; AHN,H.S.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.; WALKER,R.W.:
Indoleamine-N-methyltransferase in human lung
Biochem. Pharmacol. 21, 712 (1972)

64. MANDEL,L.R.; ROSENZWEIG,S.; KUEHL,A.F.:
Purification and substrate specificity of indoleamine-N-methyl transferase
Biochem. Pharmacol. 20, 712 (1971)

65. MANDEL,L.R.; WALKER,R.:
The biosynthesis of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in vivo
Life Sci. 15, 1457 (1974)

66. MANDELL,A.J.; BUCKINGHAM,B.; SEGAL,D.:
Behavioral, metabolic and enzymatic studies of a brain indoleethylamine N-methylating system
Adv. in Behav. Biology 1, Brain Chemistry and Mental Disease, p. 37 (1971)

67. MANDELL,A.J.; MORGAN,M.:
Indole(ethyl)amine N-methyltransferase in human brain
Nature 230, 85 (1971)

68. MARTIN,W.R.; SLOAN,J.W.; CHRISTIAN,S.T.; CLEMENTS,T.H.:
Brain levels of tryptamine
Psychopharmacologia 24, 331 (1972)

69. MELLER,E.; ROSENGARTEN,H.; FRIEDHOFF,A.J.:
Conversion of C^{24}-S-adenosylmethionine to C^{24}-formaldehyde and condensation with indoleamines: a side reaction in N-methyltransferase assay in blood
Life Sci. 14, 2167 (1974)

70. MILLER,F.P.; MAICKEL,R.P.:
Life Sci. 9, 747 (1970)

71. MORGAN,M.; MANDELL,A.J.:

Indole(ethyl)amine N-methyltransferase in the brain.
Science 165, 492 (1969)

72. NARASIMHACHARI,N.; HELLER,B.; SPAIDE,J.; HASKOVEC,L.; FUJIMORI,M.; TABUSHI,K.; HIMWICH,H.E.:

Urinary studies of schizophrenics and controls
Biol. Psychiat. 3, 9 (1971a)

73. NARASIMHACHARI,N.; HELLER,B.; SPAIDE,J.; HASKOVEC,L., MELTZER,H.; STRAHILEWITH,M.; HIMWICH,H.E.:

N,N-dimethylated indoleamines in blood
Biol. Psychiat. 3, 21 (1971b)

74. NARASIMHACHARI,N.; LIN,R.L.:

Comparative studies of indolethylamine-N-methyltransferase activity by thin-layer chromatographic gas-chromatographic, gas-chromatographic-mass-spectrometric and radiometric methods
Biochem. Medic. 11, 171 (1974a)

75. NARASIMHACHARI,N.; LIN,R.L.:

A possible mechanism for the antischizophrenic action of chlorpromazine: inhibition of the formation of dimethyltryptamine by chlorpromazine metabolites
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 8, 341 (1974b)

76. NARASIMHACHARI, N.; LIN,R.L.; PLAUT,J.; LEINER,K.:

Selective and specific thin-layer chromatographic, gas chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric methods for the assay of indolethylamine N-methyltransferase activity
J. Chromatogr. 86, 123 (1973)

77. NARASIMHACHARI,N.; PLAUT,J.M.; HIMWICH,H.E.:

Indoleethylamine-N-methyltransferase in serum samples of schizophrenics and normal controls
Life Sci. 11, 221 (1972)

78. OLIVER,J.S.; SMITH,H.; WILLIAMS,D.J.:

The detection, identification and measurement of indole, tryptamine and 2-phenethylamine in putrefying human tissue
Forensic Science 9, 195 (1977)

79. OON,M.C.H.; MURRAY,R.H.; BROCKINGTON,I.F.; RODNIGHT,R.; BIRLEY,J.L.T.:
Urinary dimethyltryptamine in psychiatric patients.
Lancet 11, 1146 (1975)

80. OSMOND,H.; SMYTHIES,J.; (citing HARLEY-MASON,J.):
Schizophrenia, a new approach
J. ment. Sci. 98, 309 (1952)

81. PÖLDINGER,W.; STACH,K.:
Versuch einer Korrelation zwischen chemischer Struktur und klinischer Wirkung trizyklischer Antidepressiva in: III. Ungarische Konferenz für Therapie und pharmazeutische Forschung, 117, Budapest (1964)

82. PORTA,R.; CAMARDELLA,M.; ESPOSITIO,C.; PIETRA,G.D.:
Inhibition of indolethylamine-N-methyltransferase by aliphatic diamines
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1196 (1977)

83. ROSENGARTEN,H.; FRIEDHOFF,A.J.:
A review of recent studies of the biosynthesis and excretion of hallucinogens formed by methylation of neurotransmitters or related substances
Schizophrenia Bulletin 2, 90 (1976)

84. ROSENGARTEN,H.; MELLER,E.; FRIEDHOFF,A.J.:
Formation of dimethyltryptamine by human red cells
Paper presented at the Annual Meeting of the American Society of Neurochemistry, New Orleans (1974)

85. ROSENGARTEN,H.; MELLER,E.; FRIEDHOFF,A.J.:
Synthesis of tetrahydro-ß-carbolines from indoleamines via enzymatic formation of formaldehyd from 5-methyltetrahydrofolic acid
Biochem. Pharmacol. 24, 1759 (1975)

86. ROSENGARTEN,H.; SZEMIS,A.; PIOTROWSKI,A.; ROMASZEWKA,K.; MATSUMATO,H.; STENCKA,K.; JUS,A.:
N,N-dimethyltryptamine and bufotenin in the urine of patients with chronic and acute schizophrenic psychoses
Psychiatria Polska 4, 519 (1970)

87. SAAVEDRA,J.M.; AXELROD,J.:
Psychotomimetic N-methylated tryptamines: formation in brain in vivo and in vitro
Science 175, 1365 (1972a)

88. SAAVEDRA,J.M.; AXELROD,J.:
A specific and sensitive enzymatic assay for tryptamine in tissues
J. Pharmacol. Exp. Ther. 182, 363 (1972b)

89. SAAVEDRA,J.M.; COYLE,J.T.; AXELROD,J.:
The distribution and properties of the nonspecific N-methyltransferase in brain
J. Neurochem. 20, 743 (1973)

90. SAI-HALASZ,A.; BRUNECKER,G.; SZARA,S.:
Dimethyltryptamin: ein neues Psychotikum
Psychiatr. Neurol., Basel, 135, 285 (1957)

91. SANGIAH,S.; DOMINO,E.F.:
In vitro studies of some chlorpromazine metabolites as potential N-methyltransferase inhibitors
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 16 389 (1977)

92. SAPPER,H.; LOHMANN,W.:
Self-association and binding sites of some psychotomimetic tryptamine derivatives and related compounds: nuclear magnetic resonance investigations
Mol. Pharmacol. 12, 605 (1976)

93. SZARA,S.:
Dimethyltryptamine. Its metabolism in man, and relation of its psychotic effects to the serotonin metabolism
Experientia 11, 441 (1956)

94. SZARA,S.:
The comparisan of the psychotic effect of tryptamine derivatives with the effects of mescaline and LSD-25 in self-experiments in Psychotropic Drugs, ed. by S.Garattini and V.Ghetti, p. 460, Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1957)

95. SLOAN,J.W.; MARTIN,W.R.; CLEMENTS,T.C.; BRIDGES,S.R.; BUCHWALD,W.F.:
Brain levels of tryptamine (T) in the cat, dog, guinea pig and rat
Fed. Proc. 33, 468 (1974)

96. THITHAPANDHA,A.: Substrate specificity and heterogenity of N-methyltransferase
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 301 (1972)

97. WALDMEIER,P.C.; MAITRE,L.:
3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC): a possible endogenous inhibitor of indoleamine-N-methylation in the rat brain
Experientia (Basel) 30, 456 (1974)

98. WALKER,R.W.; AHN,H.S.; MANDEL,L.R.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.:
Identification of N,N-dimethyltryptamine as the product of an in vitro enzymatic methylation
Anal. Biochem. 47, 228 (1972)

99. WILHELM,M.; KUHN,R.:
Versuch einer stereochemisch-strukturellen Klassifizierung der Trizyklus-Psychopharmaka mit Einschluß der Dibenzo-bicyclo-octadiene
Pharmakopsych. Neuro-Psychopharmacol. 3, 317 (1970)

100. WURTMAN,R.J.; AXELROD,J.:
Adv. Pharmac. 6A, 141 (1968)

101. WYATT,R.J.; GILLEN,J.C.; KAPLAN,J.; STILLMAN,R.; MANDEL,L.R.; AHN,H.S.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.; WALKER,R.W.:
DMT - A possible relationship to schizophrenia
Advances in Biochemica Psychopharmacology 11, 299, Serotonin-New Vistas, ed. by E.Costa, G.L.Gessa and M.Sandler, Raven Press, New York (1974)

102. WYATT,R.J.; MANDEL,L.R.; AHN,H.S.; WALKER,R.W.; VAN DEN HEUVEL,W.J.A.:
Gas-chromatographic-mass-spectrometric isotope dilution determination of N,N-dimethyltryptamine concentrations in normlas and psychiatric patients.
Psychopharmacologia 31, 265 (1973a)

103. WYATT,R.J.; SAAVEDRA,J.M.; AXELROD,J.:
A dimethyltryptamine forming enzyme in human blood
Am. J. Psychiat. 130, 754 (1973)

104. WYATT,R.J.; SAAVEDRA,J.M.; BELMAKER,R.; COHEN,ST.; POLLIN,W.: The dimethyltryptamine-forming enzyme in blood platelets: a study in monozygotic twins discordant for schizophrenia Am. J. Psychiat. 130, 1359 (1973c)

105. ZIGEUNER,G.: Chemie der Psychopharmaka Vortrag anläßlich der 11. Wissenschaftlichen Fortbildungstagung der österreichischen Apothekerkammer in Bad Hofgastein (1978)

Herrn Professor Dr. D.A. Kalbhen gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und für viele wertvolle Ratschläge.

Herrn Professor Dr. R. Domenjoz danke ich für sein förderndes Interesse an den vorliegenden Untersuchungen und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. H.J. Roth möchte ich für die Genehmigung danken, die Arbeit im Pharmakologischen Institut der Universität durchzuführen.

Herrn Dr. F. Witassek und Herrn G.D. Jakubszik gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Untersuchungen.

LEBENSLAUF

Am 20. April 1946 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Josef Strösser und seiner Ehefrau Anne-Marie in Hennef-Sieg geboren.

Von 1952 bis 1957 besuchte ich dort die Grundschule und anschließend das Staatliche Gymnasium in Siegburg, wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte. Nach einer zweijährigen Dienstzeit bei der Bundeswehr wurde ich am 2. Januar 1969 als Praktikant in der Bahnhof-Apotheke, Siegburg eingestellt; das pharmazeutische Vorexamen bestand ich im März 1971. Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn das Studium der Pharmazie, das ich im April 1975 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen nach neuer Approbationsordnung beendete.

Seit September 1975 bin ich am Pharmakologischen Institut der Universität Bonn tätig.